

Untersuchungen an Lactatdehydrogenase-Lösung nach Röntgenbestrahlung

von

Klaus Kunigk

aus

Hildesheim

Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Untersuchungen an Lactatdehydrogenase-Lösung nach Röntgenbestrahlung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Klaus Kunigk

aus

Hildeshelm

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 1973

Inhaltsübersicht

	Seite
1. EINLEITUNG UND THEMA	1
2. METHODISCHER TEIL	4
2.1. Einleitung zum Methodischen Teil	4
2.2. Materialien und Geräte	4
2.2.1. Materialien	4
2.2.2. Geräte	5
2.3. Allgemeine Labormethoden	6
2.3.1. Sterile Arbeitsbedingungen	6
2.3.2. Pufferwahl	6
2.3.3. Bau der Chromatographiesäulen	7
2.3.4. Messung des Proteingehaltes	12
2.4. Vorbereitung der Enzymlösung	12
2.5. Bestrahlung	13
2.5.1. Bau des Probengefäßes	13
2.5.2. Bestrahlungsbedingungen	14
2.5.3. Strahlenqualität und Dosisleistung	16
2.5.4. Dosismessung	17
2.6. Aktivitätsmessung	23
2.6.1. Prinzip	23
2.6.2. Messgleichung	24
2.6.3. Reaktionsbedingungen	26
2.7. Gelchromatographie	26
2.8. Aminosäurenanalyse	28

	Seite
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Entsalzen der Enzymkristallsuspension	29
3.2. Dosis - Effekt - Kurven	29
3.3. Gelchromatographie	34
3.3.1. Prinzip	34
3.3.2. Eignung der Methode	37
3.3.3. Verbesserungen	37
3.3.4. Scheinbares Molekulargewicht	39
3.3.5. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte	42
3.3.5.1. Auftrennung reiner LDH-R-M- lösung nach Bestrahlung	42
3.3.5.2. Auftrennung nach Bestrahlung in Anwesenheit von EDTA	49
3.4. Aminosäurenanalyse	53
4. DISKUSSION	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	66
6. LITERATUR	

1. Einleitung und Thema

Zugleich mit der Entdeckung der ionisierenden Strahlen durch Röntgen (1895) und Becquerel (1896) wurde ihre biologische Wirkung beobachtet. Wenige Jahre später erfolgte noch ohne genaue Kenntnis der Wirkungsweise ihre Anwendung in der Strahlentherapie des Hautkrebses (1899) und bald darauf die Entdeckung der gegenteiligen, krebs-erregenden Wirkung der Röntgenstrahlen (1902). Seither hat sich die Erforschung physikalischer, chemischer und biologischer Strahlenwirkung, ihrer therapeutischen und sonstigen technischen Verwendbarkeit zu einem bedeutenden Zweig der Wissenschaft entwickelt. Obwohl alle Gebiete der Strahlenbiologie in engem Zusammenhang miteinander stehen und meist mehrere Disziplinen daran arbeiten, nimmt man eine Einteilung in die medizinische Strahlenbiologie sowie eine naturwissenschaftlich orientierte Strahlenbiologie vor, wobei sich die letztere mit der Erforschung von Gegenständen mehr theoretischen Interesses befaßt.

Die Methode der exakten Naturwissenschaften führte dazu, die Untersuchung komplexer Systeme wie der Zelle oder ganzer Organismen zu ergänzen durch Untersuchungen an Bestandteilen oder einfachen Modellen derselben, in der Hoffnung, durch Übertragen der daran gewonnenen Erkenntnisse ein besseres Verständnis der Vorgänge am Gesamtsystem zu erreichen. Daher wurden biologische Makromoleküle isoliert und in trockenem Zustand sowie in wässriger Lösung bestrahlt. Das führte zur Entdeckung zweier Reaktionswege der Strahlenwirkung, des direkten Effektes, d. h. der Absorption von Energie im Molekül selbst, sowie des indirekten Effektes, wobei Energieträger durch Radiolyse

des umgebenden Mediums gebildet werden und am Molekül angreifen. Die Entwicklung des Strahlenschadens erfolgt in beiden Fällen in vier zeitlich auf die Applikation der Strahlung folgenden Phasen:

I. Physikalische Phase (10^{-16} sec):

Energieabsorption im Molekül oder im umgebenden Medium. Ionisation und Anregung der Moleküle.

II. Physikalisch-chemische Phase (10^{-10} sec):

Intramolekulare Energiewanderungen und Umlagerungen. Bildung von Radikalen.

III. Chemische Phase (10^{-6} sec):

Sekundärreaktionen der primärgeschädigten Moleküle. Ausbildung manifester molekularer Veränderungen.

VI. Biologische Phase (bis zu mehreren Jahren):

Wirkung an Zellen und am Gesamtorganismus. Strahlenkrankheit.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Strahlenwirkung auf LDH in wässriger Lösung und den dabei entstehenden Produkten. Es werden also, um die Einordnung in den Rahmen des oben gesagten vorzunehmen, am einfachen Modell einer Proteinlösung der indirekte Effekt der Radiolyseprodukte des Wassers auf das Molekül und die Veränderungen der chemischen Phase studiert.

Die Gründe für die Verwendung eines Enzyms und die Wahl der LDH im besonderen gibt bereits P. DENKL in seiner Arbeit an. (1) Enzyme lassen sich in hoher Reinheit darstellen und ihre biologische Funktion ist ein empfindlicher Gradmesser der Strahlenschädigung. LDH zählt zu den bestuntersuchten Enzymen (2) und weist einige Unterschiede zu den bisher hinsichtlich ihrer Bestrahlungsprodukte und deren Größenveränderungen untersuchten Enzymen Ribonuklease und Lysozym (3-12) auf, worin das Interesse

an entsprechenden Untersuchungen mit LDH begründet ist.
Diese Unterschiede sind folgende:

- I. Das Molekulargewicht ist um den Faktor 10 höher: 142 000.
- II. LDH besitzt eine kompliziertere Tertiär und Quartärstruktur. Das Molekül ist ein Tetrameres aus vier Untereinheiten vom MG ") 36 000.
- III. LDH enthält keine Disulfidbrücken, sondern 22 SH-Gruppen. (13)

Die wenigen Arbeiten, in denen über Untersuchungen an bestrahlter LDH berichtet wird, stammen von der Arbeitsgruppe um WINSTEAD (31, 32, 44) sowie von DENKL. Beide berichten Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung und des SH-Gehaltes.

WINSTEAD konnte eine Aggregation der Moleküle mit der Ultrazentrifuge nachweisen. DENKL fand mit der Gelchromatographie vier Produktgruppen verschiedenen Stokes'schen Radius', darunter Aggregate in geringer Menge, für deren Vorliegen auch die UV - Spektrometrie einen Hinweis erbrachte. Diese und andere Ergebnisse stimmen im Prinzip mit den an Ribonuklease gefundenen überein.

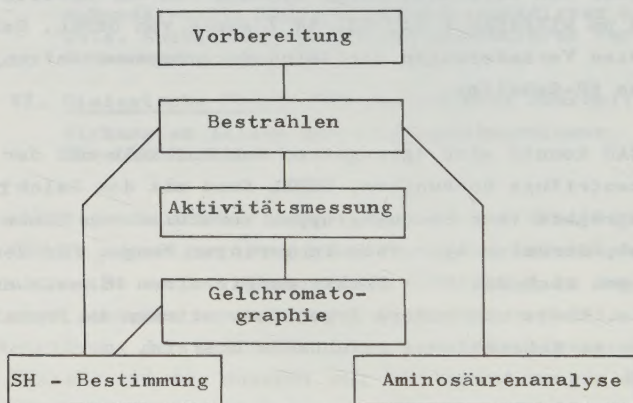
Diese Arbeit hat zum Ziel, durch Änderung der Versuchsbedingungen, Variation der Parameter und Verbesserung der Methodik der Gelchromatographie noch einmal die Aggregation nachzuweisen und darüberhinaus die Abhängigkeit der strahleninduzierten Größenveränderungen der Moleküle von Dosis und Konzentration zu studieren. Die Ergebnisse zusammen mit denen der Aktivitätsmessung und der Aminosäurenanalyse werden mit der Literatur verglichen und es wird der Versuch gemacht, Rückschlüsse auf die Vorgänge bei der Strahleninaktivierung zu ziehen.

") Abkürzung: Molekulargewicht, MG.

2. Methodischer Teil

2.1 Einleitung zum Methodischen Teil

Die Gliederung des folgenden methodischen Abschnittes folgt dem chronologischen Ablauf eines Experimentes. Lediglich ein kurzer Abschnitt über allgemeine Labormethoden ist vorangestellt. Die SH - Bestimmung war Gegenstand der Arbeit von E. MÜLLER. Entsprechende Angaben finden sich dort. (13)



2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Materialien

Laktatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel "), EC 1.1.1.27, wurde als Kristallsuspension in 2.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von der Fa. Boehringer - Mannheim GmbH, 68 Mannheim, bezogen. Fremdaktivitäten anderer Enzyme bezogen auf die spezifische Aktivität von LDH-R-M je kleiner 0.01 %.

") Abkürzung: Laktatdehydrogenase = LDH, oder LDH-R-M von LDH - rabbit - muscle.

β - Nikotinamidadenindinukleotid "), in reduzierter Form als di-Natriumsalz, Fa. Boehringer-Mannheim GmbH, 68 Mannheim, Reinheitsgrad I.
 Äthylendiamintetraessigsäure - di - Natriumsalz "), Reinheitsgrad p.a., Ninhydrin, Reinheitsgrad p.a., Fa. Serva Feinbiochemica GmbH und Co, 69 Heidelberg.
 Pyruvat - mono - Natriumsalz, Fa. Boehringer - Mannheim GmbH, Typische Analyse: Pyruvat-Na 98%, Pyruvat (enzym.) 78%.
 Sephadex, Dextrangel für die Gelchromatographie, G 25 fine, G 200, Fa. Pharmacia, Upsala, Schweden.
 Nutrient Broth und Bacto Agar zur Herstellung von Bakterien-nährböden, Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA.
 Bidestilliertes H_2O wurde aus demineralisiertem Wasser durch Destillation in einer Quarzapparatur hergestellt.
 Alle weiteren verwendeten Chemikalien lieferte die Fa. E. Merck, 61 Darmstadt, im Reinheitsgrad p.a..

2.2.2 Geräte

Chromatographiesäulen wurden in eigener Werkstatt gebaut.
 Einzelheiten siehe Abschnitt 2.3.3.
 Kühltruhen der Fa. Colora Meßtechnik GmbH, 8000 München.
 Fraktionssammler der Fa. LKB - Produkter, Stockholm, Schweden, Typ 7000 Ultrorac.
 pH - Meter 27 und O_2 - Elektrode der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark.
 Spektralphotometer PMQ - II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, mit Quarz - Infrasil -, Quarz - Suprasil - Küvetten der Fa. Hellma, 433 Mülheim.
 Therapie - Röntgenröhre TR 300 f der Fa. Siemens, Bereich Medizinische Technik, 852 Erlangen.

") Abkürzungen: β -Nikotinamidadenindinukleotid = NAD
 Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA,
 von Ethylene-diamine-tetraacetic-acid.

Kondiometer und zylindrische Membrankammer, $\varnothing$ 6 mm,
der Fa. Physikalisch-technische Werkstätten
Dr. Pychlau KG., 78 Freiburg.
Ysi-Model 42 SC Telethermometer der Fa. Yellow Springs,
Yellow Springs, Ohio, USA.
Eppendorf Photometer mit Thermoküvette und Eppendorf
Mikroliter-System der Fa. Eppendorf Gerätebau
Netheler und Hinz, 2 Hamburg.
9100 A Calculator der Fa. Hewlett Packard, Loveland,
Colorado, USA.
Aminosäuren-Analysator BC 200 der Fa. Biocal, 8 München.

2.3 Allgemeine Labormethoden

2.3.1 Sterile Arbeitsbedingungen

Alle Gefäße, mit denen das Enzym Kontakt bekam, wurden bei 120°C im überhitzten Wasserdampf sterilisiert oder mit 70 Vol.%igem Methanol desinfiziert, um Bakterienbefall zu vermeiden. Die Chromatographiesäulen wurden durch regelmäßige Bakterienkultur des Eluates auf Sterilität geprüft und nötigenfalls mit 0.02% NaN_3 von Mikroorganismen befreit. Schwermetallionen in Glasgefäßen und Säulen wurden durch Spülen mit EDTA in millimolarer Konzentration so gut wie möglich entfernt.

2.3.2 Pufferwahl

Der Puffer, in dem das Enzym aufbewahrt und auch bestrahlt wurde, bestand aus $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ der Konzentration 0.067 M. Er wurde durch Mischen der Bestandteile auf pH 7.1 eingestellt und hatte dabei die Ionenstärke μ , von 0.15. Ähnliche Werte dieser Größen werden für das Zytoplasma der tierischen Zelle angegeben. (14, 15)

Die Aktivität des Enzyms blieb in diesem Puffer bei 6°C auch nach Bestrahlung vier Wochen lang unverändert, sofern kein Befall durch Bakterien eintrat. Über längere Zeiträume haben wir die Untersuchungen nicht fortgeführt.

Die Elektrolytbestandteile dieses Puffers, Na^+ , K^+ , PO_4^{--} , unterliegen in wässriger Lösung praktisch keiner Radiolyse durch Röntgenstrahlen.

2.3.3 Bau der Chromatographiesäulen

Die Gelfiltration an Sephadex wurde im Ablauf eines Experimentes zweimal eingesetzt: Bei der Vorbereitung des käuflichen LDH - Präparates und bei der Auftrennung des bestrahlten Enzyms. Zu diesem Zweck wurden zwei Chromatographiesäulen mit Kühlmantel entworfen und gebaut. Ein äußeres Rohr bildete den Kühlmantel, ein inneres, dünnwandiges Rohr diente der Aufnahme der stationären Phase, in diesem Falle Sephadex - Dextran - Gel. Es wurde an beiden Enden durch zylindrische Stopfen, in welche die Schlauchanschlüsse montiert waren, abgeschlossen.

Die folgenden Abbildungen geben den schematischen Aufbau und die Konstruktionsdetails mit Abmessungen wieder.
(Abb. 1 - 4)

Die Innenrohre und die Kühlmäntel wurden aus Plexiglas gefertigt, die Verschußzylinder aus Trovidur Hartplastik. Die Anschlußschläuche bestanden aus Teflon, die Schrauben aus Messing. Zu Dichtungszwecken fanden Weichgummi - O - Ringe Verwendung.

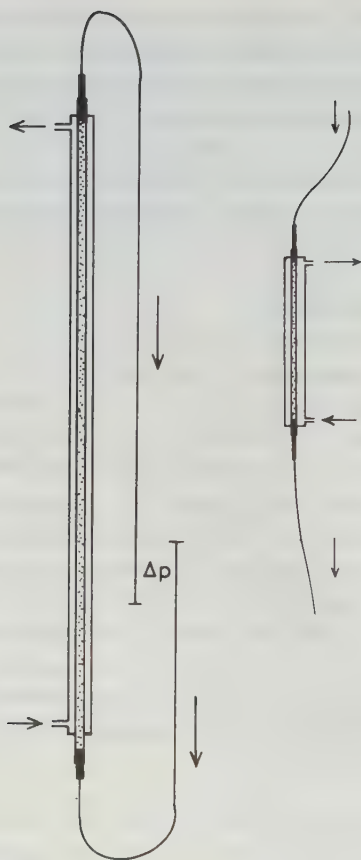


Abb. 1

Schematische Darstellung der Chromatographiesäulen.

Große Säule: Länge 210 cm, Innendurchmesser 2 cm
Durchfluß entgegen der Schwerkraft. Gelpackung:
Sephadex G 200. Der Durchflußdruck (Δp 15 - 23cm H₂O)
wurde zwischen Ein- und Auslauf in Anwendung des
Prinzips der kommunizierenden Röhren hergestellt
und durch Verwendung einer Mariott'schen Flasche
als Pufferreservoir konstant gehalten.

Kleine Säule: Länge 45 cm, Innendurchmesser 1.4 cm.
Durchfluß in Schwerkraftrichtung. Druck 100 - 150cm H₂O.
Gelpackung: Sephadex G 25 fine.

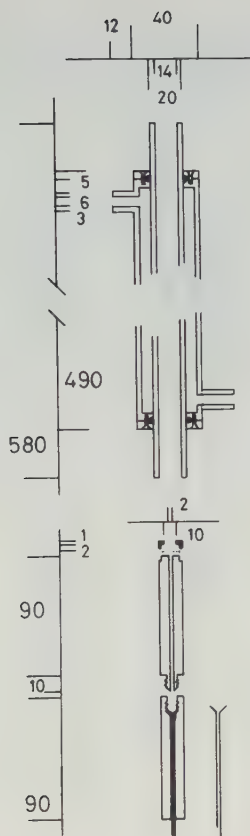


Abb. 2

Konstruktionsdetails und Abmessungen der kleinen Säule. Alle Maßangaben in mm. Der Verschußzylinder ist für beide Enden gleich gearbeitet. Der trichterförmig aufgeschmolzene Teflonschlauch wird durch Verschrauben der beiden Teile im Verschußzylinder befestigt.

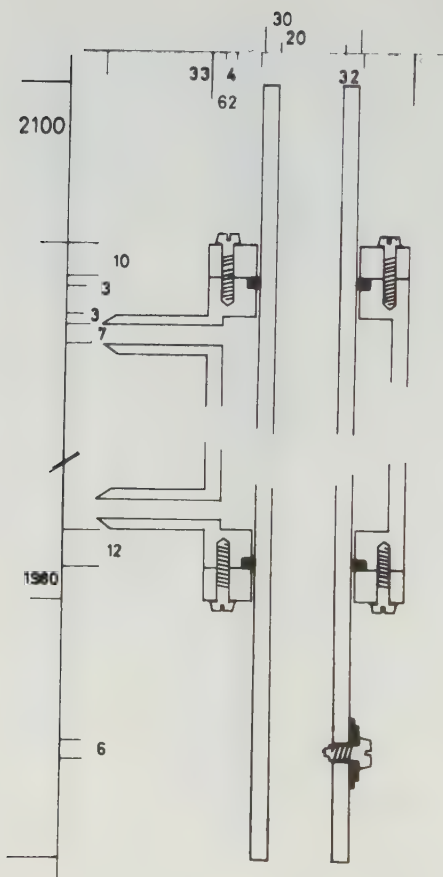


Abb. 3

Konstruktionsdetails und Abmessungen der großen Säule. Der Kühlmantel enthält das Chromatographierohr, das nur durch Quetschdichtungen darin festgehalten wird.

Im unteren Ende des Rohres sitzt eine Stiftschraube als Führungsdorn für den Stempelvortrieb.

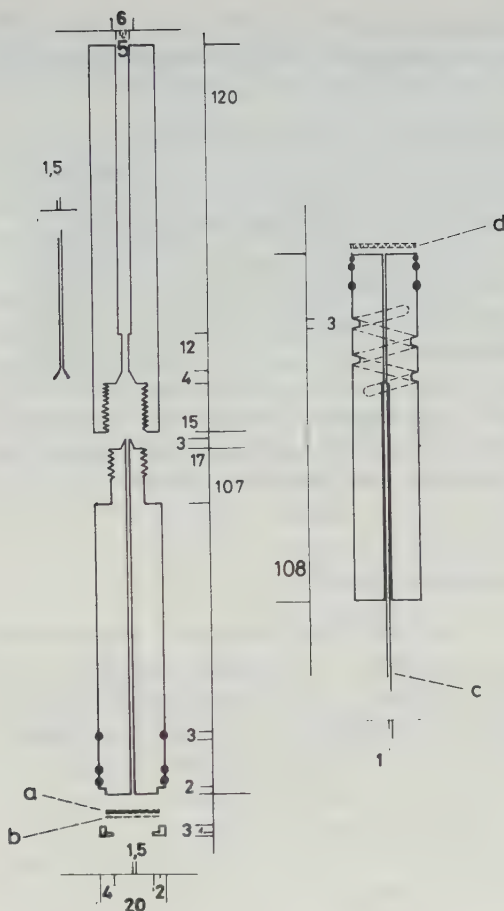


Abb. 4

Links: Oberer Verschußzylinder der großen Säule. Schlauchanschluß wie bei der kleinen Säule (s. Abb. 2). Das Filter, welches das Gel am Ausfließen hindert, besteht aus je einer Lage Glasfasergewebe (a) und Perlongewebe (b) und wird durch einen Klemmring fixiert.

Rechts: Unterer Verschußzylinder der großen Säule. Der Teflonschlauch (c) ist eingeklebt. Das Glasfaserfilter (d) liegt ohne weitere Befestigung direkt dem Stempel auf. Das Stempelgewinde, dem die Stiftschraube im Plexiglasrohr als Widerlager dient, ermöglicht es, den Stempel nachzustellen, wenn das Gelbettvolumen abnimmt (Verluste durch Auswaschen von winzigen Dextranbruchstücken).

2.3.4 Messung des Proteingehaltes

Die Konzentration des Enzyms wurde mit Hilfe der Beziehung

$$c \text{ (mg/ml)} = \epsilon_{280} \cdot E \cdot d$$

spektrophotometrisch bei Spaltbreite 0.1 mm bestimmt. Als Extinktionskoeffizienten verwendeten wir den in der Literatur angegebenen Wert $\epsilon_{280} = 1.44 \frac{\text{mg}}{\text{ml} \cdot \text{cm}}$ (16/17). Bis zu einer Konzentration von 3.5 mg/ml haben wir eine Konzentrationsabhängigkeit nicht beobachtet. Eine Veränderung von ϵ_{280} durch Bestrahlung haben wir vernachlässigt, da die Abweichung höchstens 10 % beträgt (1). Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Die Vergleichsküvette, gegen die gemessen wurde, enthielt den jeweils benutzten Puffer.

2.4. Vorbereitung der Enzymlösung

Das LDH - Präparat lag als Kristallsuspension in 2.2 M Ammoniumsulfat vor und mußte vor Bestrahlung vom Ammoniumsalz gereinigt und in den Bestrahlungspuffer überführt werden. Hierzu wurde die Kristallsuspension des Enzyms zunächst 1:1 mit Phosphatpuffer verdünnt und dadurch in Lösung gebracht. Die Trennung erfolgte in einer Säule über ein Gelbett von Sephadex G 25 fine der Abmessungen 1.4 mal 50.0 cm. Das Gelbett war zuvor mit 500 ml des Puffers äquilibriert worden, der zur Elution des Proteins benutzt wurde. Das Eluat wurde unter Kühlung in Portionen von je 3.0 ml aufgefangen, die Proteinkonzentration ausgemessen und auf Anwesenheit von NH_4^+ - Ionen geprüft. Zum Nachweis diente Neßlers Reagenz. In Verdünnungsreihen von Ammoniumsulfatlösung fiel dieser Test bis zu einer Konzentration von 10^{-6}M positiv aus. In den Proteinfraktionen ließ sich mit diesem Verfahren kein NH_4^+ mehr nachweisen.

Mit 500 μ l der ersten Fraktion wurde gewöhnlich eine Nähragar-Platte beimpft und durch 36 Stunden Incubation bei 37°C auf Bakterienwachstum kontrolliert.

Die Proteinkonzentration in der Kristallsuspension betrug den Angaben des Herstellers zufolge 10 mg/ml, nach Lösen 1 : 1 in Phosphatpuffer folglich 5 mg/ml. Es wurde jeweils eine Menge von 10 ml dieser Lösung der Entsalzung durch Gelfiltration unterzogen. Von den darin enthaltenen 50 mg LDH gingen 3 - 11 mg je nach Güte der Auftrennung während der Prozedur verloren. Die wichtigsten Ursachen waren:

- Reste, die in Pipetten, Glasgefäßen und auf dem Gel haften,
- fehlerhaftes Auftragen auf die Säule
- bereits denaturiertes Protein fällt nach dem Auflösen aus und passiert die Säule nicht
- ungenaue Einwaage des Herstellers, da keine Trockeneinwaage möglich.

Die gewonnenen LDH-Fraktionen enthielten kein ausgefallenes Protein und waren nicht getrübt. Sie wurden in sterilen, von Schwermetallionen weitgehend gereinigten Reagenzgläsern aufgefangen und spätestens nach 24 h experimentell verarbeitet. Die vier Fraktionen mit der höchsten Konzentration ergaben zusammen etwa 12 ml LDH-Lösung von maximal 3.0 - 3.5 mg/ml. Die Bestrahlung des Enzyms erfolgte an Proben von 10 ml Lösung.

2. 5 Bestrahlung

2.5.1 Bau des Probengefäßes

Als Bestrahlungsgefäß diente ein Quarztöpfchen, das in einen Plexiglas - Kühlmantel eingebaut und mit Öffnungen für die Probenentnahme und die Zuleitung von Schutzgas

versehen war. Es wurde durch eine Hostaphanfolie von 0.03 mm Stärke abgeschlossen. Der Kühlmantel mit dem Gefäß stand über einem Magnetrührer. Den Raum zwischen Kühler und Magnetrührer füllte ein 5 cm dicker Plexiglasblock aus. Dadurch entstand zwischen der Probe und den Metallteilen des Rührers eine unter Einschluß des Kühlmantels 8 cm starke Schicht Röntgenstrahlen gegenüber wasseräquivalenten Materials. Der Durchmesser des Töpfchens wurde so bemessen, daß bei 10 ml Probenvolumen die Schichtdicke 1.0 cm betrug. (Abb. 5)

2.5.2 Bestrahlungsbedingungen

Ein Kühlumlauf sorgte für eine gleichmäßige Proben-temperatur von 4.0 ± 1.0 °C während der Bestrahlung. Der Sauerstoff wurde durch ein Schutzgas, Stickstoff oder Argon, aus der Probe verdrängt. Das Gas wurde eine Stunde vor Beginn der Bestrahlung bis zum Ende des Versuches unter Rühren mit einem teflonbeschichteten Magnetrührstäbchen über die LDH-Lösung geleitet. Es wurde zunächst bei 4.0 °C mit Wasser gesättigt, ehe es durch eine eigene Zuleitung in das Töpfchen trat, und verließ es wieder durch den Stutzen für die Probenentnahme. Die Mikropipette mußte also zur Entnahme von Proben gegen den Gasstrom eingeführt werden, wobei schwerlich Sauerstoff ins Innere eingeschleppt werden konnte. Zwischen den Entnahmen war der Stutzen durch Hostaphanfolie abgedeckt.

Der O_2 - Gehalt bei Verdrängung durch Stickstoff betrug nach einer Stunde noch $30.3 \cdot 10^{-6}$ Mol/l in einer LDH - Lösung von 3.48 mg/ml. Das entspricht 1.2 Molekülen O_2 pro LDH - Molekül. Bei gleichbleibendem O_2 - Gehalt steigt dieser Quotient, wenn die LDH - Konzentration abnimmt, auf 2.1 für 2.0 mg/ml und 4.2 für 1.0 mg/ml. bei den geringen Absolutbeträgen ist nicht zu erwarten, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit oder ihre Konzentrationsabhängigkeit davon beeinflußt werden. Der Sauer-

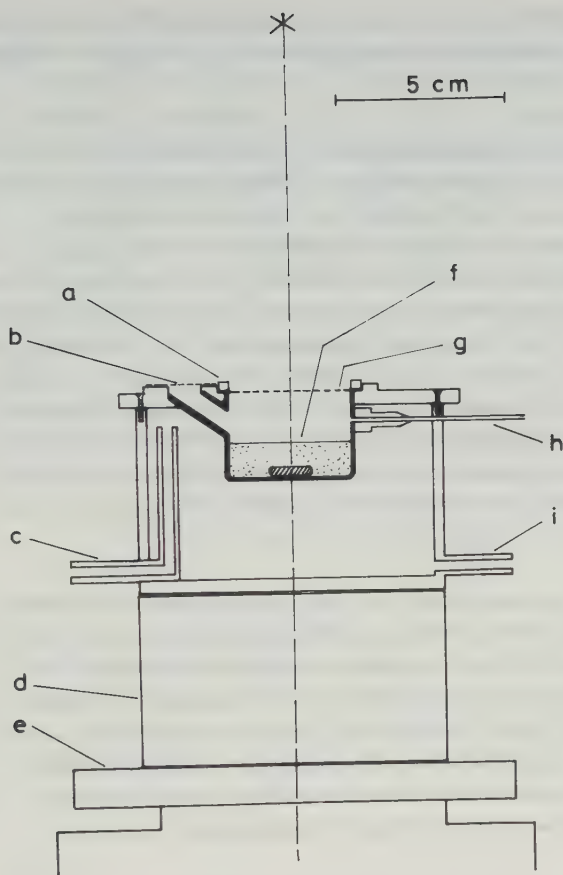


Abb. 5

Das Probengefäß mit Kühlmantel ist im Schnitt dargestellt, darunter Plexiglasblock (d) und Magnetrührer (e). Auf der median eingezeichneten Achse des Strahlenganges ist der effektive Fokus markiert. Das Quarztöpfchen ist in den Deckel des Kühlmantels eingeklebt. Es bedeuten:

- c Kühlmittel-Abfluß
- i Kühlmittelzufluß
- h Gaszuleitung, Teflonschlauch. Hier aus didaktischen Gründen um 45° in die Schnittebene gedreht.
- b Stutzen für Probenentnahme und Gasauslass, durch Hostaphanfolie verschlossen. (Flatterventil)
- f Quarztöpfchen mit Probe und teflonbeschichtetem Magnetrührstäbchen
- a Klemmring
- g Hostaphanfolie, Dicke 0,03 mm

stoff - Effekt bei Bestrahlung in wässriger Lösung nimmt erst bei erheblichen Änderungen des O_2 - Gehaltes störende Ausmaße an. (18)

Für die angegebenen Werte des O_2 - Gehaltes ergibt sich aus Abschätzung des Einflusses von Luftdruck- und Temperaturschwankungen eine maximal zu erwartende Streuung von $\pm 10 \%$. Bei Verwendung von Argon als Schutzgas lagen die angegebenen Werte um 20 % höher. Ein Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Versuche ließ sich nicht beobachten. So betrug in der längsten Versuchsreihe (9 Versuche, Bestrahlung in Abwesenheit von EDTA, Verwendung von Argon wie auch von N_2 , LDH - Konzentration größer 3.0 mg/ml) die mittlere Streuung $\bar{\sigma}$ der $D_{37} \pm 12.5 \%$ und entsprach damit im wesentlichen der Streuung der Konzentrationen zwischen 3.14 mg/ml und 3.48 mg/ml von 11 %, die in der Versuchsreihe vorlag.

Unabhängig von der Dauer des Versuchs wurden bei jeder Bestrahlung zur Bestimmung der Dosiseffektkurven 10 Proben zu je 50 μ l in gleichmäßigen Abständen entnommen. Anfangs- und Endwert wurden doppelt bestimmt. Die optimale Kurve wurde durch Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate aus den Meßpunkten ermittelt. Angaben über Restaktivitäten oder Inaktivierungsdosen wurden aus diesen Kurven extrapoliert.

2.5.3 Strahlenqualität und Dosisleistung

Die verwendeten Röntgenstrahlen wurden mit der Siemensanlage Stabilipan 300 erzeugt. Die Erzeugerspannung betrug 200 KV bei 20 mA Röhrenstrom. Das Spektrum wurde ungefiltert verwendet, abgesehen von der Eigenfilterung der Röhre, die 2 mm Aluminium entsprach. Der effektive Fokus befand sich im Abstand von 124 mm von der Probenoberfläche (Abb. 5).

Die Dosisleistung wurde unter den gleichen Bedingungen über die Entladung einer Kondensatorkammer bestimmt. Anstelle der Probe war im Versuchsaufbau ein Plexiglasphantom angebracht, welches in Schichtmitte die Messkammer enthielt. Diese Anordnung erlaubt eine Messung der Dosis unter zwei Voraussetzungen:

- Im zeitlichen Mittel müssen sich alle LDH - Moleküle in Schichtmitte befinden. Diese Voraussetzung darf als erfüllt angesehen werden, da die Probe ständig gerührt wurde.
- Der Dosisabfall über die Schicht muß nahezu linear sein. Die Anwendung des Absorptionsgesetzes für Röntgenstrahlen auf den vorliegenden Fall ergibt, daß dies in erster Näherung zutrifft (Abb. 6).

Die Differenzen, die sich daraus ergeben, daß während des Versuchs durch Probenentnahme sich der Fokusabstand zur Probenoberfläche um 0.5 mm vergrößert, wurden vernachlässigt ($0.5 \text{ mm} \hat{=} 0.47\%$ der Gesamthöhe).

Die Messung ergab für die Dosisleistung einen Wert von 2400 R/min, entsprechend 2220 rad/min. Detaillierte Angaben zur Dosismessung sind in einem Anhang zusammengefaßt.

2.5.4 Durchführung der Dosismessung

Meßbedingungen

Abweichend von den in 2.5.2 / 2.5.3 angegebenen Bestrahlungsbedingungen wurde die Dosismessung aus den nachfolgend angegebenen Gründen bei niedrigem Röhrenstrom und kurzen Bestrahlungszeiten durchgeführt. Der Aufbau blieb unver-

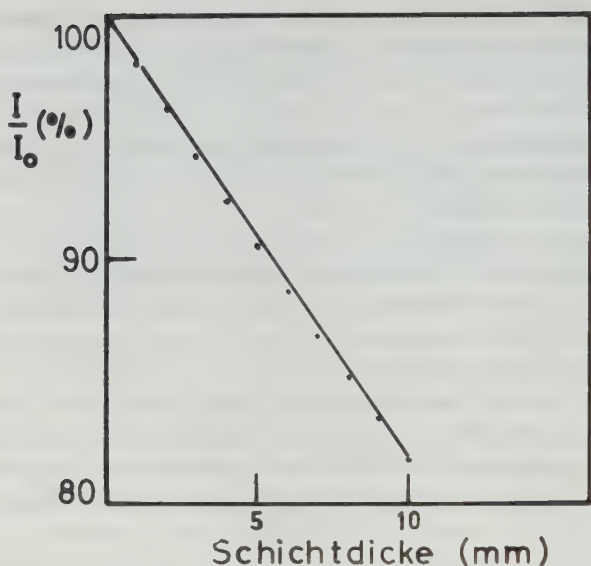


Abb. 6

Die mittlere Photonenenergie der verwendeten Strahlung beträgt 50 KeV, Schichtdicke 1.0 cm, Absorber: Wasser = 1.0 g/cm³.

Aus dem Zusammenhang

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{\mu}{\rho} \cdot \rho \cdot d} \quad \text{mit} \quad \frac{\mu}{\rho} (50\text{KeV}) = 0.2 \text{ cm}^2/\text{g}$$

ergibt sich für den Dosisabfall über die Schicht die abgebildete Exponentialkurve (· · · · ·). Die Abweichung der Kurve vom linearen Verlauf (———) ist so gering, daß sie vernachlässigt wird. Die Verwendung der Gleichung ist insofern nicht korrekt, als sie streng nur für monochromatische Strahlung gilt. Eine Aufhärtung des Spektrums ist nicht berücksichtigt.

ändert und gewährleistete hinsichtlich der Streuung bei allen Messungen identische Verhältnisse.

Dosismeßgerät

Kondiometer der Fa. Pychlau, Freiburg, mit Membrankammer 10 q (6 mm Durchmesser, 17 mm Länge). Abmessungen des Plexiglasphantoms (36 mm Durchmesser, 10 mm Höhe) wie die der Probe.

Eichung

Für die Membrankammer wurde durch Vergleich mit einer von der Physikalisch-technischen Bundesanstalt kalibrierten Siemens - Fingerhutkammer (E 24 - P2 - 507) der Eichfaktor ermittelt. Aus dem Zusammenhang

$$\frac{\text{wahre Dosis (Fingerhutkammer)}}{\text{Ablesewert am Kondiometer}} = \text{Eichfaktor}$$

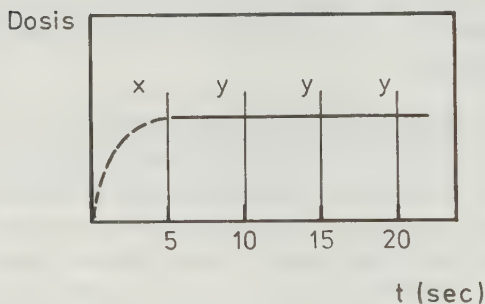
wurde die Dosis in R berechnet. Für die vorliegenden Bedingungen ergab sich ein Eichfaktor von 26.4 R/Skalenteile ") für die Membrankammer 10 q.

Dosismessung bei kurzen Bestrahlungszeiten

An der verwendeten Anlage stellte sich erst 5 sec nach dem Einschalten eine konstante Dosisleistung ein. Bei der mehrstündigen Bestrahlung der Enzymproben konnte diese Einregelung vernachlässigt werden. Da die Größenverhältnisse des Versuchsaufbaues die Verwendung der Membrankammer erforderten, deren Kapazität jedoch nach ca. 1800 R ausgeschöpft war, wurde der Röhrenstrom während der Messungen herabgesetzt. Aus dem linearen Zusammenhang zwischen Dosis und Röhrenstrom kann auf den in den Versuchen vorliegenden Wert (20 mA) umgerechnet werden. Zur Kontrolle wurden Messungen bei 2 mA, 6 mA und 10 mA durchgeführt.

") Abkürzung: Skalenteile = Sktl.

Selbst bei 2 mA Röhrenstrom lag die Größenordnung der Bestrahlungszeit bis zur Erschöpfung der Kapazität der Membrankammer im Bereich von Minuten. Aus diesem Grund, sowie ferner, um im Bereich des kleinsten Fehlers des Kondiometers messen zu können, mußten die Meßzeiten sehr kurz sein und daher der Einregelungszeitraum berücksichtigt werden. Bezeichnet man die Dosis in diesem Zeitraum (0 - 5 sec) mit x , (s. Schemazeichnung), die in den folgenden 5, 10, 15 usw. sec mit y , $2y$, $3y$, usw., dann ergibt sich eine Anzahl Gleichungen mit zwei Unbekannten, aus denen sich y ermitteln läßt. Aus y (Sktl./5 sec) bezogen auf 2 mA Röhrenstrom geht durch Umrechnung der Wert der Dosisleistung (R/min) bei 20 mA Röhrenstrom hervor. Entsprechende Vorversuche ergaben, daß die inkonstante Dosisleistung im Zeitraum x die Messung erheblich verfälschen würde.



Meßergebnisse

Meßwerte, m, in Sktl.

2 mA

	m =	t _{sec}	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅	$\bar{m}$	$\pm$
a	x + y	10	2.70	2.74	2.80	2.73	2.70	2.73	$\pm$ 0.04
b	x + 2y	15	3.40	3.50	3.42	3.45	3.50	3.45	$\pm$ 0.05
c	x + 3y	20	4.15	4.20	4.29	4.31	4.23	4.24	$\pm$ 0.07
d	x + 4y	25	5.10	4.95	5.05	4.95	4.93	5.00	$\pm$ 0.07
e	x + 5y	30	5.61	5.80	5.70	5.71	5.79	5.72	$\pm$ 0.08
f	x + 7y	40	7.29	7.20	7.29	7.30	7.32	7.28	$\pm$ 0.05
g	x + 8y	45	7.85	7.91	8.10	8.18	7.95	8.00	$\pm$ 0.14

Unter Verwendung von $\bar{m}$ und durch Kombination aller Gleichungen ergab sich für y :

ab 0.72	bc 0.79	cd 0.76	de 0.72	ef 0.78	fg 0.72
ac 0.755	bd 0.775	ce 0.74	df 0.76	eg 0.76	
ad 0.757	be 0.765	cf 0.76	dg 0.75		
ae 0.748	bf 0.764	cg 0.752			
af 0.758	bg 0.758				
ag 0.753					

$$\bar{y} = 0.755 \pm 0.018 \text{ Sktl./5 sec}$$

6 mA

Da die Dosisleistung bei 6 mA um den Faktor drei höher sein muß, als bei 2 mA, y jedoch auf 2 mA bezogen sein soll, gilt für 10 sec Meßzeit: m = 3x + 3y. Entsprechend für längere Meßzeiten.

	m=	t _{sec}	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅	$\bar{m}$	$\pm$
a	3x + 3y	10	4.60	4.60	4.72	4.60	4.61	4.63	± 0.05
b	3x + 6y	15	6.93	6.95	6.93	6.90	6.95	6.93	± 0.02
c	3x + 9y	20	9.10	9.11	9.16	9.10	9.13	9.13	± 0.04
d	3x + 12y	25	11.45	11.54	11.50	11.60	11.50	11.52	± 0.06

ab	bc	cd
0.767	0.733	0.797
ac	bd	
0.755	0.765	
ad		
0.766		

$$\bar{y} = 0.764 \pm 0.021 \text{ Sktl./5sec}$$

10 mA

Meßzeit 10 sec : m = 5x + 5y. Entsprechend für alle t.

	m=	t _{sec}	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅	$\bar{m}$	$\pm$
a	5x + 5y	10	6.23	6.20	6.32	6.40	6.20	6.27	± 0.09
b	5x + 10y	15	9.70	9.93	9.80	9.90	9.79	9.82	± 0.09
c	5x + 15y	20	13.48	13.50	13.51	13.51	13.56	13.51	± 0.03

ab	bc
0.718	0.754
ac	
0.736	

$$\bar{y} = 0.736 \pm 0.018 \text{ Sktl./5 sec}$$

Mittelwert aller Mittelwerte für y:

$$\bar{\bar{y}} = 0.752 \pm 0.014 \text{ Sktl./5sec}$$

Nach Umrechnung ergibt sich : Dosisleistung entspricht 9.024 Sktl./min
bezogen auf 2 mA Röhrenstrom, gemessen mit Membrankammer 10 q.

Berechnung der Dosisleistung

Der für die Membrankammer 10 q gültige Eichfaktor wurde bei 24 °C Raumtemperatur und 740 mm Hg Luftdruck ermittelt. Die Dosismessung wurde bei 24.2 °C und 743 mm Hg durchgeführt. Die Abweichungen liegen unter dem Mittleren Fehler des Mittelwertes des Gesamtergebnisses und werden vernachlässigt.

Der Eichfaktor für die Kammer 10 q bei Verwendung der Meßverstärkung "3" am Kondiometer betrug bei der verwendeten Strahlenqualität 26.4. Damit erhält man die Dosisleistung bezogen auf 20 mA aus

$$\text{Dosisleistung (R/min)} = 9.024 \cdot 26.4 \cdot 10 = 2383$$

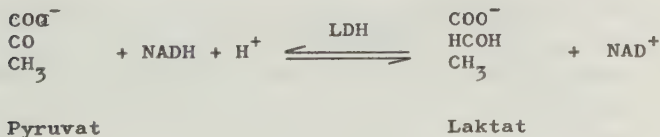
Die Umrechnung der Ionendosis (R) in die Energiedosis (rad) nach DIN 6809 ergibt mit $\text{rad} / \text{R} = 0.93$ für Wasser den Wert 2220 rad/min für die Dosisleistung in der Probe. Der Massenanteil gelöster Substanzen in der Probe beträgt 0.945 % und wird vernachlässigt.

2.6 Aktivitätsmessung

2.6.1 Prinzip

Die Enzymaktivität haben wir nach dem von Warburg und Christian angegebenen (19/20) und heute allgemein üblichen Prinzip (21,22) im optischen Test ermittelt, und in Internationalen Einheiten ") angegeben.

LDH katalysiert die Reaktion



") Abkürzung: IU, von International unit

Die Richtung des Ablaufs ist durch das Massenwirkungsgesetz bestimmt. Bei der Reduktion von Pyruvat zu Laktat wird stöchiometrisch 1 Mol NADH pro Mol Pyruvat verbraucht. Die Abnahme von NADH wird photometrisch in Abhängigkeit von der Zeit gemessen und dient als Maß für die Enzymaktivität. Die Abnahme von NADH läßt sich bei 334 nm im Photometer verfolgen, weil es im Gegensatz zu NAD bei dieser Wellenlänge eine Absorption aufweist.

2.6.2 Meßgleichung

Aus der bekannten Gleichung

$$(1) \quad E = c \cdot \epsilon \cdot d$$

ergibt sich nach entsprechender Umformung und Ergänzung

$$(2) \quad \frac{-\Delta E_{334}}{\Delta t} = \frac{\epsilon_{334} \cdot -\Delta c^{\text{NADH}} \cdot d}{\Delta t} \quad (\text{min}^{-1})$$

als Ansatz für eine Bestimmungsgleichung. Darin bedeutet

- $-\Delta E_{334}$ = Extinktionsabnahme bei 334nm, gemessen im linearen Anfangsteil der Kurve. (Abb. 6 b)
- Δt = Zeitraum, über den die Extinktionsabnahme gemessen wird, = 1.0 min.
- ϵ_{334} = Millimolarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 334nm, = 6.0 (l/mMol . cm)
- $-\Delta c$ = Konzentrationsabnahme von NADH, (mMol/l) = ($\mu\text{Mol/ml}$)
- d = Schichtdicke, (cm) = 1.0 cm.

Die Proteinlösungen wurden wegen ihrer meist hohen Konzentrationen verdünnt, ehe sie in den Testansatz einpipettiert wurden, Verdünnungsfaktor $1/F_1$. Durch das Auflösen von 100 μl dieser Gebrauchsverdünnung im Testansatz von insgesamt 3200 μl trat eine weitere,

stets gleiche Verdünnung der Ausgangslösung um einen Faktor $1/F_2$ ein, der ebenfalls in der Rechnung berücksichtigt werden muß. Mit der Einführung von F_1 und F_2 , unter Einhaltung der Bedingung $\Delta t = 1.0 \text{ min}$, $d = 1.0 \text{ cm}$ und weil die Abnahme von NADH stöchiometrisch gleich dem Umsatz an Pyruvat ist, darf man als Bestimmungsgleichung für den Pyruvat-Umsatz schreiben

$$(3) \quad \frac{-\Delta C_{\text{Pyruvat}}}{\Delta t} = \frac{-\Delta E_{334} \cdot F_1 \cdot F_2}{\epsilon_{334} \cdot \Delta t} \quad \left(\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right)$$

Darin sind F_2 und ϵ_{334} bekannt und konstant, F_1 wird zweckmäßig gewählt, $-\Delta E_{334}/t$ ist die Meßgröße und $-\Delta C$ die Bestimmungsgröße.

Eine Internationale Einheit, IU, ist definiert als der Umsatz von ein $\mu \text{ Mol}$ Substrat/min und wird auf ein Volumen von 1.0 ml bezogen. Bedingungen sind die Ausführung des Tests bei 25°C sowie bei Substrat- und pH-Optimum des Enzyms. Die angegebene Bestimmungsgleichung liefert demnach Werte in der Einheit IU/ml. Ferner wird in der Arbeit von der Größe "Spezifische Aktivität" Gebrauch gemacht, die sich bei bekannter Enzymkonzentration ergibt aus

$$\frac{\text{Aktivität (IU/ml)}}{\text{Konzentration (mg/ml)}} \quad (\text{IU/mg})$$

Im Bereich der verwendeten Enzymkonzentrationen von 1.0 bis 3.5 mg/ml betrug der Verdünnungsfaktor F_1 etwa 200 bis 400. Hierbei war die mittlere Streuung σ der Messung $\pm 3.0 \%$. Nach der chromatographischen Auftrennung liegen in manchen Fraktionen sehr geringe Enzymkonzentrationen vor. Der in diesem Falle größere Ablesefehler am Photometer und vor allem die bei Konzentrationen unter 0.1 - 0.15 mg/ml auftretende

"Verdünnungsdenaturierung" (23) führen zum Anwachsen der mittleren Streuung auf $\pm 18\%$.

2.6.3 Reaktionsbedingungen

Die Enzymkonzentrationen im Testansatz wurden so gewählt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit noch ein gutes und sicheres Ablesen der Extinktion am Photometer erlaubte. Beim unbestrahlten Enzym betrug die Konzentration an LDH im Testansatz ca. $1.0 \cdot 10^{-9}$ Mol/l.

Im linearen Anfangsteil der Reaktionsgeschwindigkeitskurve (Abb. 7) wurde E_{334} im Abstand von 15 sec gemessen und $-\Delta E_{334}/\text{min}$ bestimmt.

Der Testansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

1. 3.0 ml Phosphatpuffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4
2. 0.05 ml NADH, 7.1 mg/ml in 1.0% NaHCO_3
3. 0.1 ml Enzymverdünnung

Start mit

4. 0.05 ml Pyruvat, 0.1 M in Aqua bidest. Entsprechend 1.5 mM im fertigen Testansatz.

Das pH- Optimum von 7.4 wurde im Institut bestimmt. (24)

Das Substratoptimum von 1.5 mM/l Pyruvat wird in der Literatur angegeben. (25)

2.7 Gelchromatographie

Nach der Röntgenbestrahlung wurden die Enzymlösungen über eine Säule von Sephadex G 200 aufgetrennt. Das aufgetragene Volumen betrug 8 - 9 ml bei wechselnden Konzentrationen. Die Maße des Gelbettes betrugen 2 x 200 cm. Die Elution wurde mit Phosphatpuffer durchgeführt (s. 2.3.2),

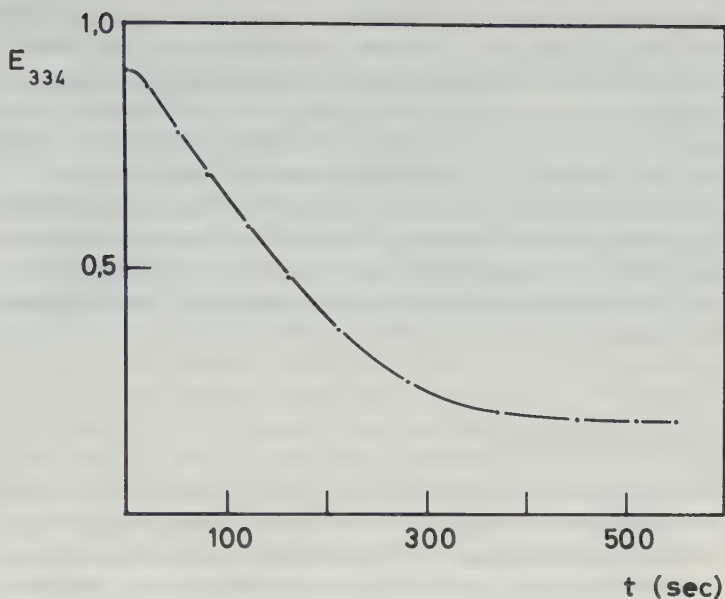


Abb. 7

Abnahme der Extinction von NADH in Abhängigkeit von der Zeit während der durch LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat in Lactat. Nach Verdünnung der Ausgangslösung und Zugeben zum Testansatz betrug die LDH - Konzentration im Ansatz $1,4 \cdot 10^{-4}$ mg/ml. Übrige Bedingungen im Text (1.6.3).

der stets 1.0 mM/l EDTA enthielt, um eine nachträgliche Blockierung von SH - Gruppen zu verhindern, die einen zusätzlichen Aktivitätsverlust zur Folge hätte. Als Pufferreservoir diente eine Mariotte'sche Flasche, die den Pufferdruck auf die Säule konstant hielt. Die Flasche war mit einem N₂ - Behälter verbunden, damit keine Kontamination der Säule mit Keimen aus der nachströmenden Umgebungsluft stattfinden konnte. Die Vorbereitung des Gels und das Packen der Säule wurde im allgemeinen nach Angaben des Herstellers und der Anleitung von DETERMANN vorgenommen. (26)

2.8 Aminosäurenanalyse

Native und bestrahlte LDH wurden der Analyse unterzogen, um Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung zu erfassen. Dazu wurden die Enzymproben durch Gelfiltration an Sephadex G 25 fine (Gelbett 1.4 mal 50 cm) aus dem üblichen Phosphatpuffer in 0.01 M Ammoniumacetat - Lösung überführt. Durch dreimaliges Gefriertrocknen und Wiederaufnehmen in Aqua bidest, wurde das im Vakuum flüchtige Ammoniumacetat entfernt. Zur Hydrolyse wurden je 3 mg Trockeneinwaage des Enzyms mit 1.0 ml 6n HCl bei $8 \cdot 10^{-3}$ Torr in Ampullen abgeschmolzen. Die Hydrolyse dauerte 24 Stunden bei 110 °C. Danach wurde die Hydrolyse-lösung im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mehrmals in Aqua bidest. aufgenommen und wieder eingeeengt. Dadurch konnte die Hauptmenge der Säure entfernt werden.

Die Analyse selbst wurde nach der Methode von SPACKMAN, STEIN und MOORE (27) mit einem automatischen Aminosäure-analysator ausgeführt. Unter Zugrundelegung eines MG von 142000 erfolgte die Berechnung der Zahl der Aminosäuren pro Molekül LDH - R - M aus den gefundenen Verhältnissen der Aminosäuren zueinander, wobei für Leucin die Zahl 140 Aminosäuren pro Molekül als Bezugswert verwendet wird. (28/29)

3. Ergebnisse

3.1 Entsalzen der Enzymkristallsuspension

Durch Gelchromatographie an Sephadex G 25 fine konnte das native Enzym von dem Ammoniumsulfat und anderen Verunreinigungen mit kleinem Molekulargewicht, die im Ausgangspräparat enthalten sind, vollständig getrennt werden. In Abb. 8 ist ein typisches Elutionsdiagramm dargestellt. Auch in den Ammoniumsulfat enthaltenden Fraktionen ist bei 280 nm eine geringe Extinktion nachweisbar, als deren Ursache man Fremdproteine eines MG unter 10000 annehmen muß. Die erreichten Konzentrationen (3.0 - 3.5 mg/ml, s. Abschnitt 2.4) lassen sich erhöhen, wenn man bei der Reinigung nicht von der Kristallsuspension ausgeht, sondern nach vorsichtigem Zentrifugieren das aus LDH - Kristallen bestehende Sediment verwendet. Wegen der hohen Kosten wurde hierauf verzichtet. Die gewonnene Proteinlösung erwies sich in der Gelchromatographie über Sephadex G 200 als homogene Fraktion mit einheitlicher Molekülgröße (Abb. 9). Die Spezifische Aktivität in dieser Fraktion betrug 540 IU/mg $\pm$ 7% gegenüber 360 IU/mg im Ausgangspräparat nach Angaben des Herstellers (30). Das Chromatogramm diente zugleich als Kontrollversuch zum Vergleich mit den an bestrahlter LDH gewonnenen Ergebnissen.

3.2 Dosiseffektkurven

Die Enzymaktivität von LDH - R - M zeigte bei Bestrahlung unter den angegebenen Bedingungen (Abschnitt 2.5) einen exponentiellen Abfall in Abhängigkeit von der Dosis. In Anwesenheit von 1.0 mM/l EDTA waren um den Faktor zwei höhere Dosen erforderlich, um den gleichen Aktivitätsverlust hervorzurufen, wie er bei Bestrahlung ohne diese Substanz erreicht wurde. (Abb. 10 und 11)

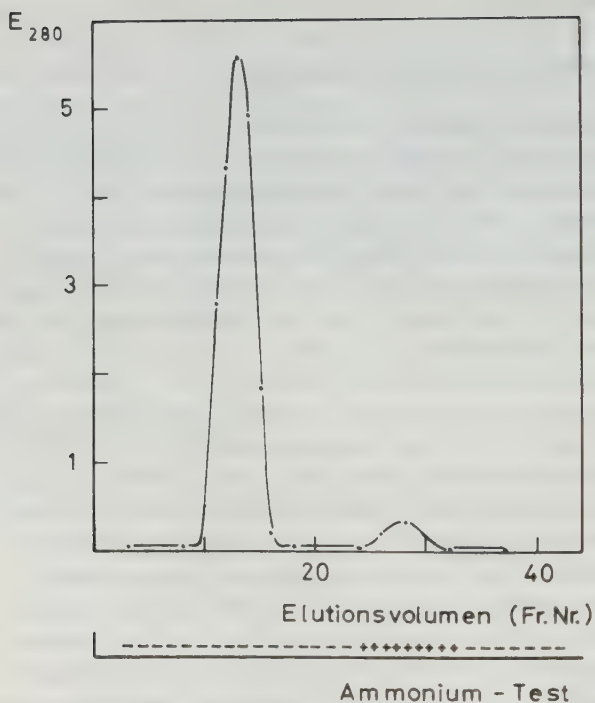


Abb. 8

Entsalzen der Ammoniumsulfat enthaltenden Ausgangs-
 lösung des Enzyms durch Gelfiltration über
 Sephadex G 25 fine. Säulenabmessungen 1.4 x 50 cm.
 Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1, J 0.15.
 An der zweiten Abszisse: Ammonium - Test mit
 Neßlers Reagenz.

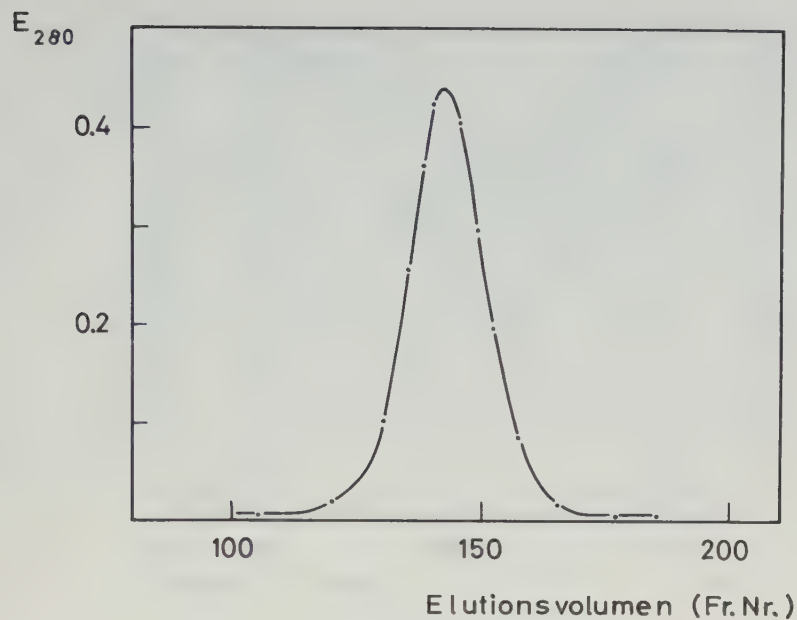


Abb. 9

Gelchromatographie gereinigter LDH - R - M über Sephadex G 200. Säulenabmessungen 2 x 200 cm, Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1, J 0.15. Enzymaktivität s. Abb. 14 oben, Abschnitt 3.3.5.1 .

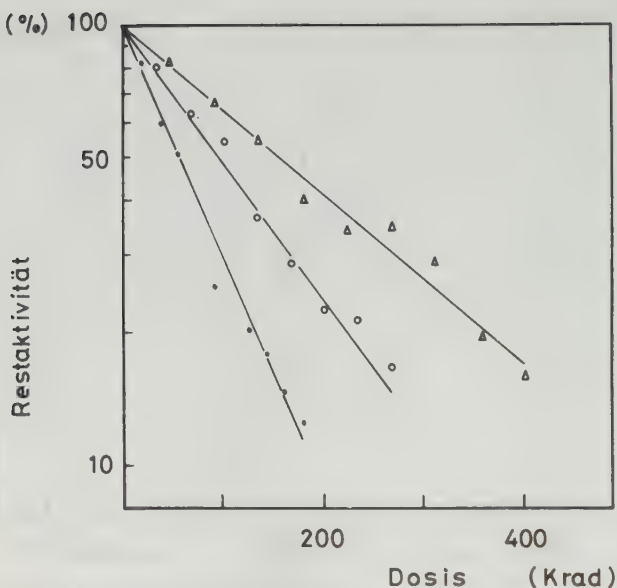


Abb. 10

Abhängigkeit der Enzymaktivität (in % des Anfangswertes) von der Strahlendosis (in Krad) bei drei Enzymkonzentrationen in Abwesenheit von EDTA. LDH - R - M in Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1, J 0.15.

—△—△—△—△— 3.5 mg/ml
 —○—○—○—○— 2.0 mg/ml
 —•—•—•—•— 1.0 mg/ml

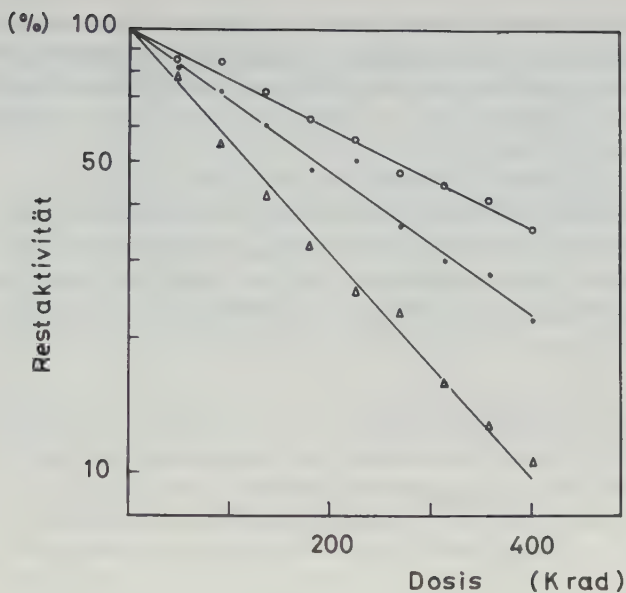


Abb. 11

Abhängigkeit der Enzymaktivität (in % des Anfangswertes) von der Strahlendosis (in Krad) bei drei Enzymkonzentrationen in Anwesenheit von EDTA. LDH - R - M in Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1, J 0.15. Der Puffer enthielt 1.0 mM/l EDTA.

—○—○—○—○— 3.5 mg/ml

—•—•—•—•— 2.0 mg/ml

—△—△—△—△— 1.0 mg/ml

In beiden Fällen war die Inaktivierung von der Enzymkonzentration abhängig. Je höher die Konzentration, desto geringer der Aktivitätsverlust, der bei gleicher Dosis gemessen wurde. Tabelle I gibt diese Zusammenhänge wieder.

Die Anwesenheit von EDTA und die Enzymkonzentration beeinflusste nicht nur die D_{37} , sondern auch die Größe, Menge und Verteilung auf einzelne Fraktionen der Strahlengeschädigten Moleküle. (s. Abschnitt 3.3.5.1/2)

D_{37} in Krad		
C mg/ml	mit EDTA	ohne EDTA
1.0	171	82
2.0	271	139
3.5	388	244

Tab. I Abhängigkeit der Inaktivierungsdosis D_{37} von der Enzymkonzentration und der Anwesenheit des Chelatbildners EDTA.

3.3 Gelchromatographie der Produkte

3.3.1 Prinzip

Das Prinzip der Gelchromatographie soll hier kurz erläutert werden, weil dies die Darstellung der methodischen Verbesserungen erleichtert und zur Verständlichkeit der Ergebnisse beiträgt. Es läßt sich vom Aufbau der Chromatographiesäule her verstehen.

Das gequollene, granuliert Gel befindet sich in einem Rohr, dessen Gesamtvolumen sich aus drei Teilvolumina zusammensetzt:

- dem Maschenwerk der Polysacharidketten, aus denen ein Gelkörnchen besteht.
- den von Lösungsmittel (Phosphatpuffer) erfüllten Hohlräumen innerhalb der Gelkörner.
- den gleichfalls von Puffer erfüllten Lücken zwischen den Gelkörnchen.

Der durch die Lücken fließende Puffer stellt die mobile Phase des Systems dar, Maschenwerk und Hohlräume der Gelkörnchen bilden die stationäre Phase. In Abb. 12 ist ein Modellfall schematisch dargestellt, in dem ein Substanzgemisch mit kleinen, mittleren und großen Molekülen im Puffer gelöst ist und mit ihm durch die Säule fließt.

Das Schema zeigt, daß kleinen Molekülen das gesamte Hohlraumsystem der Gelkörnchen zugänglich ist. Je größer dagegen ein Molekül, desto kleiner der Anteil am Hohlraumsystem, zu dem es mechanisch ungehindert Zutritt hat, da ihm nur die großen Poren im Gel offenstehen. Hieraus wird verständlich, daß gerade die kleinsten Moleküle bei der Säulenpassage am stärksten verzögert werden und das größte Durchlaufvolumen (Elutionsvolumen, V_e) erforderlich ist, um sie ganz durch die Säule zu befördern, weil sie sich länger und in größerer Zahl dem Weitertransport in der mobilen Phase durch Diffusion in die stationäre Phase hinein entziehen.

Wie in dem Diagramm der Abb. 12 dargestellt, erfolgt dadurch eine Trennung des Substanzgemisches in Fraktionen,

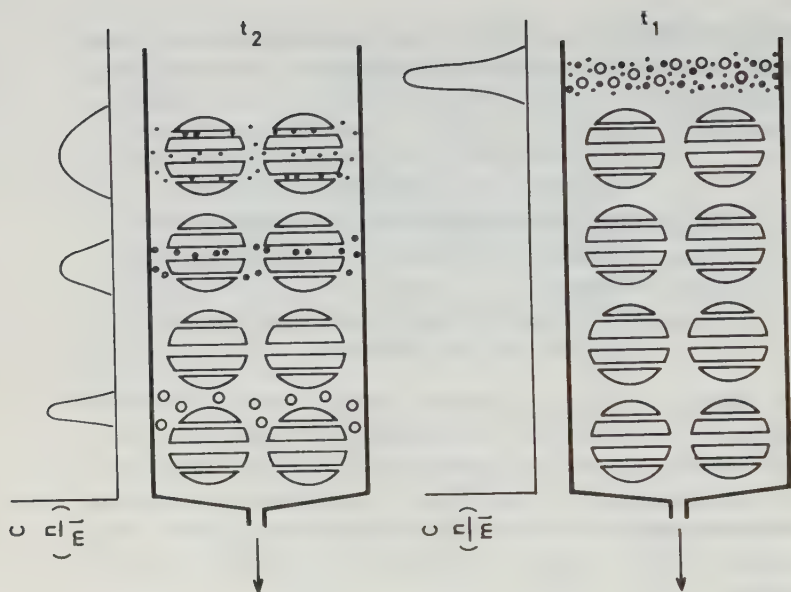


Abb. 12

Schema zur Gelchromatographie. Je acht Kugeln symbolisieren die Gelkörnchen, quer geschnittene Gänge in ihnen stellen die unterschiedlich weiten Maschen im Gelkörnchen dar. Konstanter Pufferdurchfluß von oben nach unten.

wobei abnehmender Molekülgröße ein zunehmendes Elutionsvolumen zugeordnet ist. Diese Trennung ist in einem Größenbereich möglich dessen obere Grenze von der maximalen Porenweite des Gels (Materialkonstante), dessen untere Grenze von Nebeneffekten (Diffusionsverbreiterung, abnehmende Trennschärfe) abhängig ist. Alle Moleküle jenseits der oberen Grenze werden als ggf. inhomogene Fraktion im V_o (outer volume, Ausschlußvolumen) eluiert, so bezeichnet, weil das V_o der Summe der Lücken zwischen den Gelkörnchen entspricht. (Abb. 12) Die Beziehung zwischen V_e und dem Molekulargewicht ist nur unter bestimmten Bedingungen eindeutig definiert (s. Abschnitt 3.3.4).

3.3.2 Eignung der Methode

Da die Versuche eine Größenveränderung der Moleküle erwarten lassen, wurde diese Methode angewandt. Der Ladungszustand der Teilchen beeinflusst die Trennung nicht, sofern mit einem Puffer der Jonenstärke größer 0.01 gearbeitet wird. (50) Das Dextrangel verhält sich chemisch neutral gegenüber Enzymen. Der Fraktionierungsbereich von Sephadex G 200 reicht bis in hohe Molekulargewichtsbereiche (5000 - 800000).

3.3.3 Verbesserungen

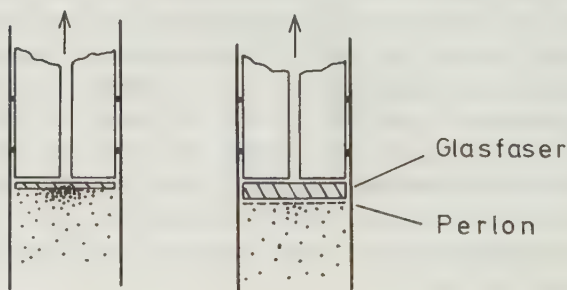
Die Deutlichkeit der Trennung hängt von der Länge der Säule ab, die daher im vorliegenden Fall 200 cm lang gewählt wurde. Das wegen der hohen Ausschlußgrenze sehr weitmaschige Gel ist in gequollenem Zustand leicht verformbar. So ergibt bereits die Summe der Gewichte der Gelkörnchen in der langen Säule Kräfte, welche die Körnchen deformieren, so zum Verschluß der Lücken zwischen ihnen führen und den Durchfluß auf Null absinken lassen. Dieser Effekt konnte durch folgende Maßnahmen unwirksam gemacht werden:

1. Pufferdurchfluß entgegen der Schwerkraft

Läßt man den Elutionspuffer von oben nach unten durch die Säule laufen, wirkt außer der Kraft G (Eigengewicht) eine weitere Kraft, K , auf das Gelkörnchen. K wird vom vorüberfließenden Puffer auf das Gelkörnchen ausgeübt und entspricht seinem Strömungswiderstand. K nimmt mit steigender Durchflußgeschwindigkeit, d. h. steigendem Durchflußdruck zu. Wenn sich wie im angenommenen Fall G und K addieren, erreicht man natürlich eher Werte, bei denen die Gelkörnchen deformiert werden, als im umgekehrten Fall. Durch Umkehr der Durchflußrichtung (von unten nach oben) kommt es zur Subtraktion von G und K , wodurch sich der anwendbare Durchflußdruck von wenigen $\text{cm}_{\text{H}_2\text{O}}$ auf 20 - 25 $\text{cm}_{\text{H}_2\text{O}}$ erhöht.

2. Verschuß des Säulenausganges

Wenn am Säulenausgang ein dünnes Filter angebracht wird, presst der Sog, welcher aus der höheren Strömungsgeschwindigkeit in der engen Ausflußbohrung resultiert (Bernoulli'sches Gesetz), die Gelkörnchen in das Filter hinein, so daß es verstopft (Skizze).



Durch Verwendung eines dicken Filters (3-5mm) läßt sich dem vorbeugen, indem der Sog durch Vergrößerung des Abstandes vermindert und auf eine größere Fläche verteilt wird. Das Eindringen der Körnchen in die Glasfaserschicht des Filters verhindert ein dünnes Perlongewebe, dessen Porenweite unter dem Durchmesser der Gelkörnchen liegt. Das Totvolumen der Säule einschließlich Zu- und Ableitungen ist mit 3.8 ml dennoch gering.

3. Herstellung der Säulenpackung

Das Gel enthält nach dem Quellen außer den 40 - 120 μ großen Körnchen noch kleinere Bruchstücke, die sorgfältig ausgewaschen wurden, weil sie das Kanälchensystem der Säule verstopfen.

Gepackt wird die Säule, indem man das in reichlich Puffer aufgeschwemmte Gel in das vorbereitete Rohr füllt und bei gleichzeitigem Pufferdurchfluß von oben nach unten sedimentieren läßt. Der Druck durfte hierbei 5 $\text{cm}_{\text{H}_2\text{O}}$ nicht übersteigen, auch nicht kurzzeitig, etwa bei der Montage von Schläuchen und Zusatzgerät.

Unter Einhaltung dieser Bedingungen konnte die Säule mit 20 - 25 $\text{cm}_{\text{H}_2\text{O}}$ Durchflußdruck betrieben werden, erreichte eine Elutionsgeschwindigkeit von 12 - 14 ml/h und bewältigte eine Trennung in 45 - 50 Stunden. Im Abstand von 6 - 8 Wochen wurden die Packungen erneuert, zeigten während dieser Zeit jedoch noch kein Absinken der Durchflußgeschwindigkeit.

3.3.4 Scheinbares Molekulargewicht

Die Ergebnisse der Gelchromatographie werden im Elutionsdiagramm dargestellt, indem an der Abszisse die aufge-

fangenen Eluatfraktionen in der Reihenfolge ihrer Nummern und an der Ordinate deren Extinktion bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt aufgetragen werden. Wie bereits ausgeführt wurde, kann vom Elutionsvolumen (V_e in Fraktionsnummern) auf den mittleren Stoke'schen Radius, im Falle globulärer Proteine mit einheitlichem Radius auf das Molekulargewicht geschlossen werden. Nicht globuläre Moleküle, die nach ihrem mittleren Stoke'schen Radius eluiert werden, erscheinen im Diagramm an der Position, an der ein globulär gebautes Teilchen vom gleichen Radius erscheinen würde. Auf diese Weise kann derartigen Molekülen ein "scheinbares Molekulargewicht" zugeordnet werden, das mit dem wirklichen nicht übereinstimmt. Es beträgt für LDH - R - M 115000 gegenüber dem tatsächlichen Wert 142000 (1). Da das LDH - Molekül annähernd die Form eines Ellipsoids besitzt (48, 49), liegt der gelchromatographisch wirksame Radius unter demjenigen eines globulären Proteins mit dem MG 142000.

In den vorliegenden Versuchen ging es darum, die relative Vergrößerung der Bestrahlungsprodukte im Vergleich zum nativen Molekül nachzuweisen und das Ausmaß der Vergrößerung im Rahmen von Veränderungen um ein scheinbares MG von 100000 abzuschätzen.

Dazu wurde unter Verwendung globulärer Proteine bekannten Molekulargewichtes ein Vergleichschromatogramm angefertigt. Verwendet wurden Rinderserum - Albumin, monomer, (MG 67000), Rinderserum - γ - Globulin, (MG 175000), Blue Dextran 2000, ein synthetisches Polysacharid mit dem mittleren MG 2 000 000 zur Markierung des Ausschlußvolumens, sowie LDH - R - M unter Annahme eines scheinbaren Molekulargewichtes von 115000 (1). Im Elutionsdiagramm (Abb. 13) wurden auf der oberen Abszisse über den zugehörigen Fraktionsnummern die Molekulargewichte der globulären Vergleichssubstanzen

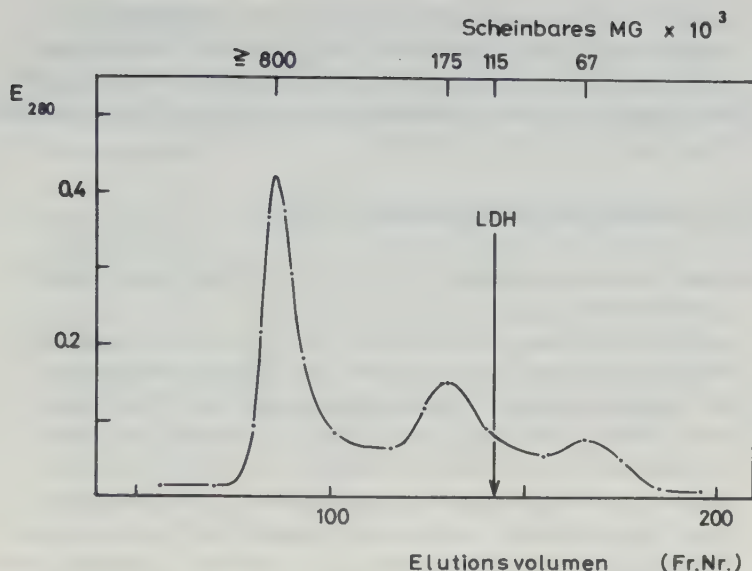


Abb. 13

Vergleichschromatogramm zur Orientierung über das scheinbare Molekulargewicht im Fraktionierungsbereich von Sephadex G 200. Säulenmaße 2 x 200 cm. Elutionsmittel Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1, J 0.15. LDH wurde separat eluiert und bei Fraktionsnummer 142 zusätzlich eingetragen. Übrige Peaks von links: Blue Dextran, mittleres MG 2 000 000; Rinder-serum - Gammaglobulin, MG 175 000; Rinder-serum - Albumin, monomer, MG 67 000; Die Position der Maxima streute bei dreimaliger Wiederholung um ± 2 Fraktionsnummern.

markiert, für das Ausschlußvolumen von Sephadex G 200 nach Angaben des Herstellers $MG \approx 800000$. Da alle Auftrennungen an derselben Säule durchgeführt wurden, konnte die Markierung der oberen Abszisse in allen entsprechenden Diagrammen verwendet werden.

3.3.5 Auftrennung der Bestrahlungsprodukte

3.3.5.1 Auftrennung reiner LDH - R - M - Lösung nach Röntgenbestrahlung

Die Auftrennung reiner LDH - R - M - Lösungen nach Bestrahlung zeigen, daß parallel zur Inaktivierung des Enzyms Reaktionen ablaufen, aus denen ein Spektrum sehr verschieden stark vergrößerter Moleküle entsteht. Das Ausmaß, in dem diese Vergrößerungen stattfinden, hängt bei im Mittel gleicher Schädigung der Moleküle, d. h. bei gleicher Restaktivität nach Bestrahlung, von der Konzentration des Enzyms, bei gleicher Konzentration dagegen von der Dosis ab.

Zum Vergleich ist in die Abbildungen 14, 15 und 16 jeweils oben ein Elutionsdiagramm nativer LDH - R - M aufgenommen, die als einheitliche Fraktion mit einheitlicher, vollständig wirksamer Aktivität eluiert wird.

In Abb. 14, Mitte, ist das Elutionsdiagramm einer Probe von 3.2 mg/ml LDH wiedergegeben, die auf 27 % Restaktivität inaktiviert wurde. Mehr als die Hälfte der Moleküle haben ein drei- bis zehnfaches ihrer ursprünglichen Größe angenommen (Gruppe II und III). Die Moleküle der Gruppe III sind im Ausschlußvolumen eluiert worden, können also eine Größe besitzen, die über diejenige hinausgeht, welche dem $MG\ 800000$ entspricht.

Die Moleküle der Gruppe II und III (Fr. Nr. 80 - 115) ") haben neben der ausgeprägten Größenzunahme auch den stärkeren Verlust ihrer Funktionsfähigkeit erlitten. In beiden Gruppen ist die Restaktivität auf weniger als 20 % gesunken.

Die Moleküle der Gruppe I dagegen haben ihre Größe nahezu beibehalten. Die geringe Verlagerung des Maximums nach links deutet auf eine leichte Vergrößerung, etwa durch Auffaltung der Tertiär- und Quartärstruktur hin. Die Restaktivität liegt mit 80 % des Ausgangswertes erheblich über derjenigen der Gruppen II und III. Jedoch tritt ein Aktivitätsverlust auch in Gruppe I ein, ohne an die Vergrößerung gebunden zu sein.

Nach Applikation einer höheren Dosis wird dieses Verhalten noch deutlicher, wie aus der Auftrennung nach Bestrahlung mit 400 Krad bis auf 15 % Restaktivität hervorgeht (Abb. 14, unten). Hier ist auch in der Gruppe I die Restaktivität auf 25 % gesunken, ohne daß hiermit eine Größenzunahme verbunden ist. Sie liegt damit nur noch um den Faktor zwei über der Restaktivität in den Gruppen II und III mit 12 %. Der Anteil der Gruppe III an den Bestrahlungsprodukten hat sich mit Zunahme der Dosis zulasten der beiden anderen Gruppen vergrößert.

Die Restaktivität in den Gruppen II und III bezogen auf Milligramm Enzym liegt auf gleichem Niveau. Dieses Verhalten zeigte sich unabhängig von der Dosis sowohl nach 250 Krad, als auch nach 400 Krad. Die Bestrahlungsprodukte weisen also im weiten Größenbereich vom scheinbaren MG 300000 bis » 800000 eine einheitliche mittlere Aktivität auf.

") Abkürzung: Fraktionsnummer = Fr. Nr.

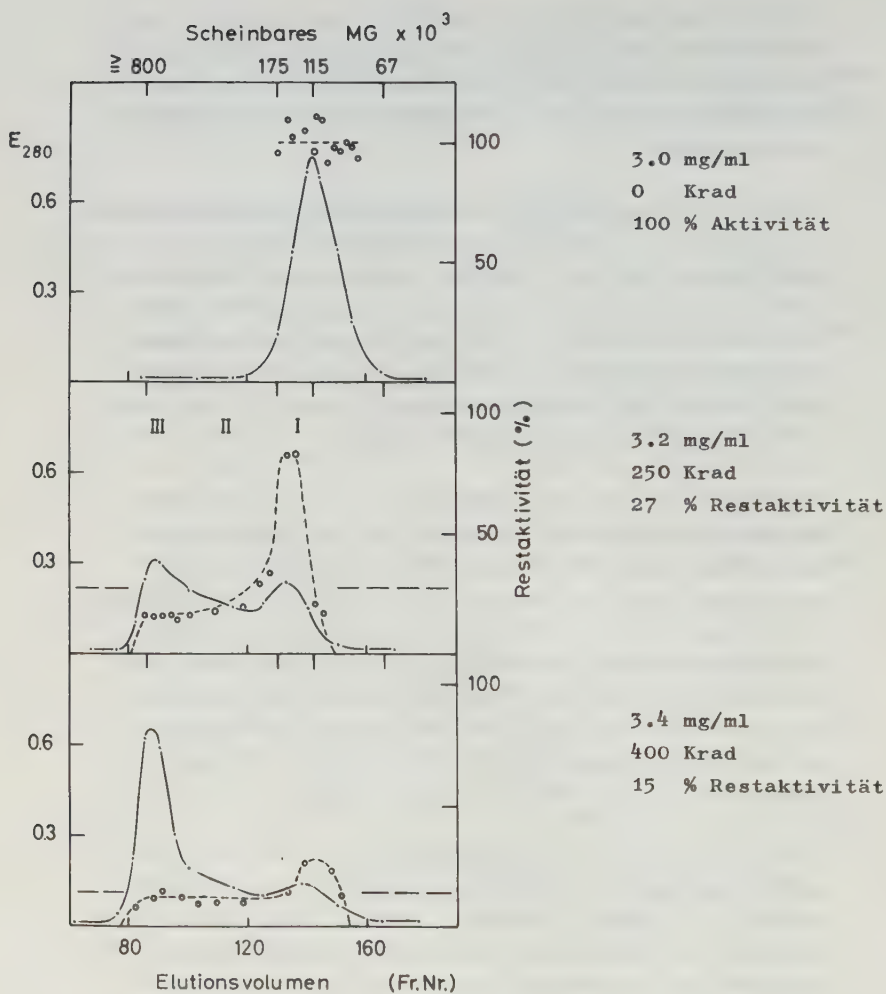


Abb. 14 (s. Seite 45)

Abb. 14 (s. Seite 44)

Auftrennungsergebnisse nach zwei verschiedenen
Bestrahlungsdosen. Ohne EDTA.

- . — . — . — . — . Proteinkonzentration als Extinktion
bei 280 nm
- 0--0--0--0--0--0-- Restaktivität des einzelnen Moleküls,
bezogen auf ein Milligramm (IU/mg)
in % des Anfangswertes.
- Restaktivität der unaufgetrennten
Probe in % des Anfangswertes.

An der zweiten, oberen Abszisse ist zur Orientierung
das scheinbare Molekulargewicht angetragen. Oben:
Kontrolle mit unbestrahlter LDH - R - M, Aktivität
um den Mittelwert streuend angegeben. Probenvolumina
7 - 9 ml. Elutionsmittel: Phosphatpuffer 0.067 M,
pH 7.1, J 0.15. Bestrahlungsparameter: 200 KV,
20 mA, Eigenfilterung.

In Abb. 15 sind drei Versuche dargestellt, bei denen die Dosis so gewählt wurde, daß trotz unterschiedlicher Konzentration die gleiche Restaktivität und damit der gleiche mittlere Beschädigungsgrad der Moleküle erreicht wurde. Dennoch sind die Reaktionsprodukte konzentrationsabhängig ganz verschieden.

Die Gruppe I als Reservoir relativ intakter Moleküle nimmt entsprechend dem Anwachsen der anderen Gruppen mit steigender Konzentration (Abb. 15, von oben nach unten) anteilmäßig ab.

In der Gruppe II findet sich ein mit zunehmender Konzentration undeutlicher werdendes Maximum. Aus den Elutionsdiagrammen allein geht nicht hervor, welche Effekte (Aggregation, Entfaltung) zur Größenzunahme dieser Moleküle führt.

Der Anteil der Gruppe III nimmt mit steigender Konzentration zu. Die Vergrößerung wird also begünstigt, wenn die Möglichkeit zur Wechselwirkung zwischen den Molekülen unter Bestrahlung größer wird. Dies ist ein gewichtiges Argument dafür, daß der zur Vergrößerung der Moleküle führende Prozeß überwiegend und zumindest für die Gruppe III in einer Aggregation der Moleküle aneinander besteht, die ja vom Zusammentreffen der Moleküle abhängig sein muß.

Weiterhin müssen an dem zur Vergrößerung führenden Prozeß nicht nur völlig zerstörte, inaktive Moleküle, sondern solche jeden Beschädigungsgrades teilnehmen können (s. o.). Das ist bei der Aggregation der Fall. Reine Entfaltung, d. h. Zerstörung der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur eines Enzyms, führt zur Inaktivität.

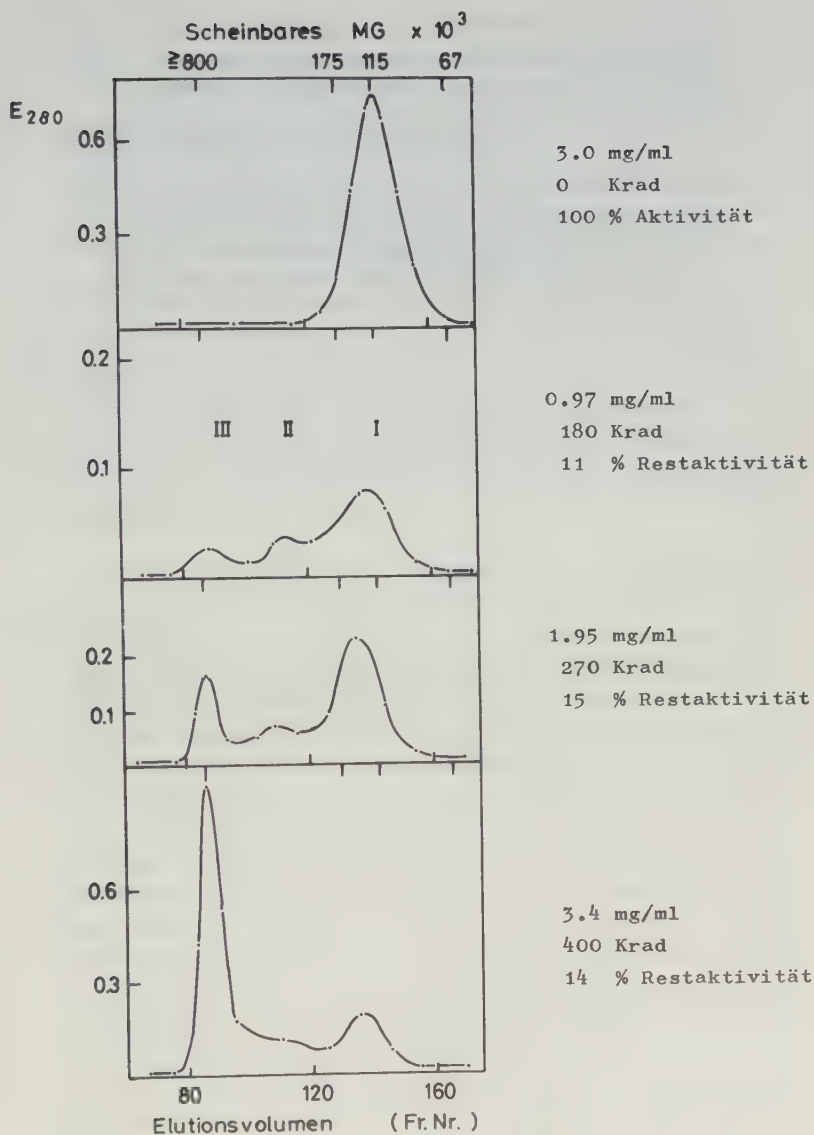


Abb. 15 (s. Seite 48)

Abb. 15 (s. Seite 47)

Auftrennung an Proben verschiedener Konzentration jedoch gleicher Restaktivität nach Bestrahlung ohne EDTA.

—•—•—•—•— Proteinkonzentration als Extinktion bei 280 nm.

Kontrollversuch und obere Abszisse wie in Abb. 14.
Elutionsmittel: Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1,
J 0.15. Bestrahlungsparameter: 200 KV, 20 mA,
Eigenfilterung. Die Fläche unter den Kurven bei
0.97 mg/ml und 1.95 mg/ml ist zur besseren
Vergleichbarkeit auf die Konzentration 3 mg/ml
extrapoliert worden.

In der Sedimentationsanalyse mit der Ultrazentrifuge konnte eine Massenzunahme der vergrößerten Teilchen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich, daß die Gruppe III wie erwartet inhomogen ist und noch wesentlich größere Teilchen enthält, als es dem scheinbaren Molekulargewicht 800000 entspricht. ") Die Ergebnisse der Gelchromatographie und der Sedimentation belegen, daß es durch Aggregation der Moleküle zur Entstehung vergrößerter Teilchen kommt.

3.3.5.2 Auftrennung nach Bestrahlung in Anwesenheit von EDTA.

EDTA wurde als Chelatbildner zum Abfangen von Schwermetallionen bei der Vorbereitung des Enzyms benutzt. Es wurden einige Bestrahlungsversuche bei Anwesenheit von EDTA im Puffer durchgeführt. Die Konzentration der Substanz betrug 1.0 mM/l.

Dabei traten im Gegensatz zu den bei der Bestrahlung ohne EDTA gefundenen Ergebnissen keine stark vergrößerten Moleküle auf. Die Ursache dieses Effektes kann nur EDTA sein. Stattdessen wiesen alle Moleküle gegenüber der unbestrahlten Kontrollprobe (Abb. 16, oben) eine leichte Volumenzunahme auf (Abb. 16, 2. von oben). Dies war bei der Gruppe I, in der sich der Hauptanteil der Moleküle befand, in geringerem Ausmaß der Fall, als bei der mengenmäßig viel kleineren Gruppe II. Die Moleküle beider Gruppen wiesen eine verschieden starke Schädigung ihrer Aktivität auf. Aus der Verlagerung des Konzentrationsmaximums der Gruppe I um 10 ± 2 Fr. Nr. nach links läßt sich eine leichte Vergrößerung des mittleren Stoke'schen Radius ablesen. Bei den Molekülen der Gruppe II, die entsprechend einem scheinbaren MG von $3 - 5 \cdot 10^5$ bei Fr.Nr. 100 - 115 eluiert werden, muß man eine Zunahme des Stoke'schen Radius auf das zwei- bis fünffache annehmen.

") Die Untersuchungen an der Ultrazentrifuge führte dankenswerterweise Herr Dipl.-Phys. G. Fey vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen für uns aus.

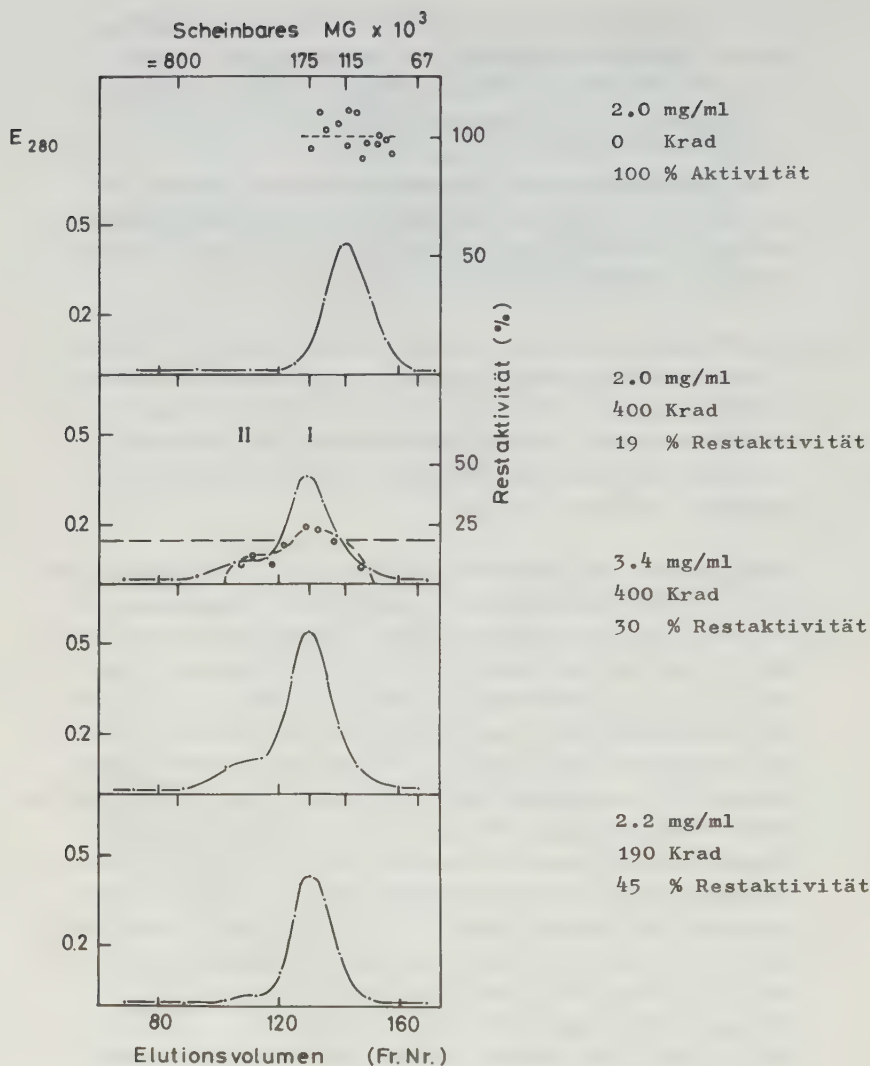


Abb. 16 (s. Seite 51)

Abb. 16 (s. Seite 50)

Auftrennung der Produkte nach Bestrahlung
in Anwesenheit von EDTA.

— . — . — . — . — Proteinkonzentration als Extinktion
bei 280 nm.

— 0 — 0 — 0 — 0 — 0 Restaktivität des einzelnen Moleküls,
bezogen auf ein Milligramm (IU/mg)
in % des Anfangswertes.

— — — — — Restaktivität der unaufgetrennten
Probe in % des Anfangswertes.

Kontrolle und obere Abszisse wie in Abb. 14.
Elutionsmittel: Phosphatpuffer 0.067 M, pH 7.1,
J 0.15. Bestrahlungsparameter: 200 KV, 20 mA,
Eigenfilterung.

Wenn das Enzym in höherer Konzentration bestrahlt wird, ändert sich das Bild nicht wesentlich (Abb. 16, 3. von oben). Die Restaktivität der gesamten Probe ist lediglich der größeren Zahl der Moleküle entsprechend etwas höher. Die beschriebenen Veränderungen sind auch dann bereits deutlich zu erkennen, wenn erst die Hälfte der im Versuch Abb. 16, 3. von oben, verabreichten Dosis zur Anwendung gebracht wurde (Abb. 16, unten). Der Anteil der zur Gruppe II gehörigen Moleküle ist geringer.

Die zugrundeliegenden Prozesse werden durch Änderungen um Faktoren dieser Größenordnung im vorliegenden Dosis- und Konzentrationsbereich offenbar quantitativ nicht unverhältnismäßig und qualitativ überhaupt nicht erkennbar beeinflusst. (Vergleiche Versuche ohne EDTA)

Die Frage, ob unter den Produkten auch kleinere Bruchstücke vorhanden sind, läßt sich aus den Versuchen nicht beantworten, da diese Bruchstücke bei Fraktionsnummern über 150 auftreten müßten. In diesem Bereich des Elutionsdiagramms ist die zeitabhängige Diffusionsverbreiterung der Peaks so ausgeprägt, daß sich geringe Mengen gar nicht im Diagramm darstellen würden.

Die spezifische Restaktivität (IU/mg) der Moleküle aus Gruppe I und II unterscheidet sich um den Faktor zwei. Die Restaktivität der unaufgetrennten Probe liegt erwartungsgemäß zwischen diesen Werten. In Abb. 16, 2. von oben, ist dieses für alle Chromatogramme mit Aktivitätsmessung repräsentative Verhalten dargestellt. Der rasche Abfall der Aktivität in den Randzonen erlaubt keine Schlußfolgerungen, weil dies bei den geringen Enzymkonzentrationen Folge von Nebeneffekten (Verdünnungsdenaturierung, stärkere Streuung der Aktivitätsmessung bei niedriger Konzentration) sein kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei gleicher Konzentration des Enzyms und vergleichbarer Restaktivität, d. h. gleicher Beschädigung der Moleküle, nur in Abwesenheit von EDTA unter Bestrahlung eine Aggregation eintritt. Aus dem Vergleich der Abb. 16, 2. von oben (2.0 mg/ml, 19 % Restaktivität) mit Abb. 15, 3. von oben (2.0 mg/ml, 15 % Restaktivität) geht dies anschaulich hervor.

3.4 Aminosäurenanalyse

Das Ausmaß der Strahlenschäden an den einzelnen Aminosäuren des Moleküls wurde durch vergleichende Aminosäurenanalyse vor und nach Bestrahlung geprüft. Die Werte für unbestrahlte LDH - R - M, die zu 95 % aus LDH V besteht, zeigen gute Übereinstimmung mit den für dieses Isoenzym gefundenen Ergebnissen (1, 28, 29), wenn man das angenommene Molekulargewicht berücksichtigt. Für die Analyse wurde LDH - R - M in der Konzentration 3 mg/ml mit 400 Krad unter N_2 bestrahlt. Die Restaktivität betrug 12 % des Ausgangswertes. Die Ergebnisse, in Tab. 2 zusammengestellt, zeigen eine signifikante Abnahme bei acht Aminosäuren: Prolin (-27%), Methionin (-23%), Histidin (-16%), Tyrosin (-10%), Phenylalanin (-9%), Arginin (-7%), Isoleucin (-7%), Glutaminsäure (-5%). In diesen Fällen liegen die zu vergleichenden Mittelwerte der Bestimmungen nativer und bestrahlter LDH - R - M außerhalb der gegenseitigen 3σ -Grenze. Die mit - 8 % merkbare Abnahme von Threonin ist nicht signifikant, da sich die 3σ -Bereiche, wenn auch nur in der dritten Dezimale nach dem Komma, überschneiden.

Ferner läßt sich nach Bestrahlung eine neugebildete Aminosäure, Cystin, nachweisen. Die gefundene Menge entspricht 10 Molekülen Cystein, die durch Bildung von Disulfidbrücken in fünf Moleküle Cystin übergegangen sind.

Aminosäure	unbestrahlt		bestrahlt (400 Krad)		% d. Kontrolle
	$\bar{M} \pm \sigma$		$\bar{M} \pm \sigma$		
Asparaginsäure	119.1	5.8	117.1	1.4	98
Threonin	47.7	2.7	43.8	1.7	92
Serin	80.4	3.3	83.4	2.6	104
Glutaminsäure	129.1	1.0	123.1	3.4	<u>95</u>
Prolin	50.4	2.8	37.0	2.2	<u>73</u>
Glycin	97.9	2.3	94.1	2.4	96
Alanin	84.1	1.3	81.3	2.7	97
Cystin/2	-	-	10.4	1.9	-
Valin	126.9	1.7	121.1	4.4	95
Methionin	34.8	2.7	26.8	3.2	<u>77</u>
Isoleucin	76.6	1.9	71.6	1.1	<u>93</u>
Leucin	140.0	-	140.0	-	100
Tyrosin	26.7	0.2	24.0	0.9	<u>90</u>
Phenylalanin	26.8	0.3	24.5	0.8	<u>91</u>
Histidin	40.7	0.7	34.2	1.4	<u>84</u>
Lysin	100.0	5.0	96.2	2.5	96
Arginin	38.8	1.4	36.1	1.5	<u>93</u>

Tabelle II

Anzahl der Aminosäuren im LDH - R - M - Molekül vor Bestrahlung (vier Einzelbestimmungen aus zwei Hydrolysen) und nach Bestrahlung unter N₂ mit 400 Krad, Restaktivität 12 %, (sechs Einzelbestimmungen aus zwei Hydrolysen).
Signifikante Abnahmen unterstrichen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Größenveränderungen, den Aktivitätsverlust und die Zerstörung von Aminosäuren im LDH - R - M Molekül unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen in wässriger Lösung bei konstantem pH 7.1 und niedriger Ionenstärke, J, 0.15. Erwartungsgemäß konnten die Charakteristika des "indirekten Effektes" der Strahlenwirkung beobachtet werden. So zeigte die D_{37} im Bereich von 1.0 - 3.5 mg/ml LDH - R - M eine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit im Sinne einer Abnahme zu niedrigen Konzentrationen hin. Das entspricht der Tatsache, daß mit abnehmender Enzymkonzentration bei konstanter Dosis der Anteil des einzelnen Moleküls an den Radiolyseprodukten des Wassers zunimmt.

Bei 2.0 mg/ml LDH - R - M beträgt die D_{37} 139 Krad und entspricht damit genau dem Wert, den DENKL unter abgesehen von der Ionenstärke nahezu gleichen Bedingungen fand. Andere Autoren konnten bei Bestrahlung unter Luft, sonst jedoch vergleichbaren Bedingungen um den Faktor zwei bis drei niedrigere Werte für die D_{37} messen als die für gleiche Konzentrationen in dieser Arbeit angegeben. (31, 32, 33)

Charakteristisch für die indirekte Strahlenwirkung ist weiterhin der Schutzeffekt von EDTA in der Konzentration 1.0 mM/l, das mit LDH - R - M um die energiereichen Radiolyseprodukte des Wassers konkurriert und durch seine Anwesenheit die D_{37} erhöht, so bei 2.0 mg/ml LDH - R - M um den Faktor zwei von 139 Krad auf 271 Krad. Es sind einige organische Substanzen bekannt, deren Anwesenheit bei Bestrahlung von LDH in Konzentration von einigen mM/l die D_{37} um Beträge ähnlicher Größenordnung erhöht. Dazu gehört Cystein, 2-Mercaptoäthylguanidin (31), Glyzerin, Dimethylsulfoxid und Serotonin. (34, 35, 36)

Im Vorgriff auf die Diskussion der Ergebnisse der Gel-chromatographie sei an dieser Stelle erwähnt, daß EDTA nicht nur einen quantitativen Effekt, - Erhöhung der D_{37}^- , produziert, sondern auch einen qualitativen Effekt, nämlich insofern, als es die Aggregation der LDH - R - M Moleküle zu verhindern imstande ist. Verstehen läßt sich dies durch die Vorstellung, daß EDTA bindungsfähige Stellen am Proteinmolekül, die unter Bestrahlung auftreten, absättigt ehe die Proteinmoleküle untereinander reagieren können. Denkbar sind Radikalstellen (kovalente Bindung) oder durch Zerstörung der nativen Tertiärstruktur an die Moleküloberfläche gelangte polare Gruppen (ionogene Bindung).

Es drängt sich in diesem Zusammenhang die Frage auf, ob der Schutzeffekt gewisser organischer Verbindungen auf die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen nicht wenigstens teilweise in der Verhinderung der Aggregation besteht. Entsprechende Untersuchungen liegen nicht vor.

Der ausgeprägte Strahlenschutzeffekt der Chelatbildner ist bekannt, sein Zustandekommen jedoch keineswegs eindeutig erklärbar. So wurde die Vorstellung ausgesprochen, daß die Entfernung vorhandener divalenter Metallionen durch Chelatbildner den Schutzeffekt hervorbringt, das denaturierende Agens unter Bestrahlung also Metallionen seien. (37, 38) Hierfür ergibt sich aus den vorliegenden Versuchen kein Anhalt. Auch ohne Bestrahlung müßten Schwermetalle durch SH - Blockierung einen Aktivitätsverlust hervorrufen. Bei Anwesenheit wie bei Abwesenheit des EDTA-di-Natriumsalzes in millimolarer Konzentration lagen die Anfangsaktivitäten der Proben gleichermaßen bei hohen Werten von 500 - 600 IU/mg. Schwermetallionen müßten, sofern in wirksamer Menge vorhanden, die Aktivität der EDTA-freien Proben vor Bestrahlung herabsetzen. Folglich ist es auch un-

wahrscheinlich, daß sich Aggregate über Metallionen-Brücken bilden, was formal denkbar wäre: $\text{Protein-O}^- - \text{Cu}^{++} - \text{O-Protein}$, $\text{Protein-S} - \text{Cu} - \text{S-Protein}$.

Die Gelchromatographie der Produkte erbrachte keinen Hinweis auf Bruchstücke. Dagegen ließen sich zwei Gruppen vergrößerter Moleküle unterscheiden (II und III). Die in der Gruppe III befindlichen, im V_0 eluierten Teilchen, sind Aggregate aus LDH - R - M Molekülen. Hierfür gibt es aus den Versuchen zwei Hinweise und zwei Beweise.

- Die Gruppe III fehlt unter den Produkten bei Zusatz von EDTA zur Probe, wodurch der Kontakt der aktivierten LDH - R - M Moleküle untereinander verhindert wird.
- Der Anteil der Gruppe III an den Produkten ist bei gleicher Restaktivität abhängig von der Enzymkonzentration, also der Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der Moleküle.
- Untersuchungen an der Ultrazentrifuge ergaben einen Massen- und Volumenzuwachs der Teilchen in Gruppe III. Diese Gruppe ist wie vermutet inhomogen. Der Anteil der Teilchen nimmt zu größeren Durchmessern hin ab.
- Die Elution der Teilchen im Ausschlußvolumen entspricht einem mehr als sechsfachen des Stoke'schen Radius des nativen Moleküls. Wie EICHHORN beweisen konnte, vermag bloße Entfaltung des globulären Protein eine solche Vergrößerung nicht vorzutäuschen. Maximal entfaltete LDH - R - M Moleküle erreichen, über G 200 eluiert, nicht das Ausschlußvolumen. (39)

Die Entstehung von Aggregaten wurde auch durch WINSTEAD (qualitativ) und DENKL (quantitativ) an bestrahlter LDH

nachgewiesen. Der Anteil des Aggregates an der Gesamtmenge der Produkte liegt bei DENKL wesentlich niedriger als in den hier beschriebenen Versuchen. Der Autor findet zudem meßbare Mengen von Bruchstücken. Die Ursache für diese Befunde könnte in der verwendeten hohen Ionenstärke (1.02) liegen. LDH dissoziiert bei hohen Ionenstärken auch in nativem Zustand zu einem gewissen Prozentsatz in seine Untereinheiten. (40) Wie oben angeführt, ergibt sich aus der Aggregation der Moleküle möglicherweise ein zusätzlicher Aktivitätsverlust. Aus der gleichen D_{37} bei DENKL und in der vorliegenden Arbeit muß jedoch geschlossen werden, daß bei geringem Ausmaß der Aggregation die Inaktivierung auch auf anderem Wege erfolgen kann. Die verschiedenen Mechanismen, die letztlich zum Aktivitätsverlust führen, können sich offenbar nach Maßgabe der gewählten Versuchsbedingungen gegenseitig vertreten. Dafür spricht auch, daß bei gleicher D_{37} in den angeführten Arbeiten ganz verschiedene Aminosäurenveränderungen gefunden wurden. Auch konnte bei gleicher Restaktivität der Moleküle, also gleichem Aktivitätsverlust, in Anwesenheit von EDTA kein Aggregat gefunden werden (Abb. 16, 2. von oben/ Abb. 15, 3. von oben). In diesem Fall ebenso wie bei der Gruppe I, dem Pool größtmäßig unveränderter Moleküle kommt die Inaktivierung unabhängig von der Aggregation zustande. Jedoch muß die Zunahme freier SH-Gruppen bei den Molekülen dieser Fraktion als Veränderung der Tertiärstruktur im Sinne einer Entfaltung gedeutet werden. (13)

Die Gruppe II enthält Teilchen des zwei- bis fünffachen scheinbaren Molekulargewichtes. Da diese Gruppe auch bei EDTA-haltigen Proben auftritt, sowie mit abnehmender LDH - R - M - Konzentration in EDTA-freien Proben eine Zunahme zeigt, dürften sich in ihr Moleküle befinden, deren Größenzunahme aus Entfaltung der globulären Struktur resultiert. Die Tatsache, daß der Anteil dieser Gruppe

bei Proben ohne EDTA, also bei nicht verhinderter Aggregation, höher ist, vor allem auch keinen Abfall, sondern einen Anstieg zur Gruppe III hin zeigt, läßt den Schluß zu, daß im Falle ermöglichter Aggregation auch kleinere Aggregate, etwa aus nichtvergrößerten oder teilvergrößerten Molekülen, hinzutreten. (Abb. 16, 2. von unten/Abb. 14, 2. von unten)

Das Vorhandensein enzymatischer Aktivität in den Gruppen II und III weist auf die Teilnahme aktiver oder teilaktiver Moleküle an der Aggregation hin. Ob jedoch nur bestimmte, bis zu einer gewissen Schwelle vorgeschädigte Moleküle, oder solche aller Schädigungsgrade, von nicht vergrößert/aktiv bis stark vergrößert/inaktiv zugelassen sind, läßt sich daraus nicht entscheiden. Beide Fälle müssen als möglich betrachtet werden.

Unter der vereinfachenden Annahme, daß alle Schädigungsgrade an der Aggregation teilnehmen, und unter Beschränkung auf den Modellfall, daß im Produktgemisch drei Arten veränderter sowie außerdem native Moleküle vorliegen, wird nachfolgend versucht, den Gruppen I, II und III Befunde, Deutungen und eine Modellvorstellung zusammenfassend zuzuordnen. (Tab. III)

Das Auftreten sowohl größermolekularer Bestrahlungsprodukte als auch einer Komponente, die ohne wesentliche Konformationsänderung Aktivitätsverluste erlitten hat, fanden auch DENKL (1) an LDH, sowie SCHÜSSLER und JUNG unter verschiedenen Bedingungen an bestrahlter Ribonuklease. (3, 4, 5, 6)

Die Aminosäurenanalyse des Produktgemisches einer mit 400 Krad bestrahlten Probe von 3.0 mg/ml LDH - R - M ergab eine Abnahme bei zahlreichen Aminosäuren. Die

Befund	Starke Vergrößerung, mehr als sechsfach Anteil nimmt mit LDH - Konzentration zu Bildung durch EDTA verhindert Enzym-Aktivität nachweisbar	Vergrößerung zweibis fünffach Anteil nimmt mit LDH - Konzentration ab Anteil wird durch EDTA geringer Enzym-Aktivität nachweisbar	Nicht vergrößert Spez. Aktivität um Faktor zwei höher als in II und III
Deutung	Aggregat aus unterschiedlich vorgeschädigten Molekülen	Kleine Aggregate aus unterschiedlich geschädigten Molekülen Entfaltete Moleküle	Native und leicht veränderte Moleküle mit leichtem Aktivitätsverlust durch gelchromatographisch nicht erfaßbare Schäden
Gruppe	III	II	I
Diagramm			
Modell			

Tab. III

Zuordnung formal denkbarer Produkte zu den gefundenen Gruppen.
Schematisiertes Elutionsdiagramm nach Bestrahlung ohne EDTA,
3 mg/ml LDH - R - M. Bedeutung der Molekül - Symbole:

- | | | | |
|---|-------------------------|---|----------------------------|
| ○ | nicht vergrößert/aktiv | ○ | nicht vergrößert/teilaktiv |
| ✱ | teilentfaltet/teilaktiv | ✱ | entfaltet/inaktiv |

Berechnung wurde mit Leucin als Bezugsamino­säure durchge­führt, wobei davon ausgegangen wurde, daß Leucin durch die verwendete Dosis unverändert bleibt. Die Reaktionsge­schwindigkeitskonstante von Leucin mit e^-_{aq} ($< 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) ist vergleichsweise gering. Obwohl dagegen diejenige des Leucin mit $\text{OH}^\cdot$ nicht sehr niedrig ist ($9.8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$), zeigt doch die Tatsache, daß sowohl Asparaginsäure ($K_{\text{OH}^\cdot} = 4.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, $K_{e^-_{aq}}$ kleiner $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) als auch Alanin ($K_{\text{OH}^\cdot} = 1.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, $K_{e^-_{aq}} = 5.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) durch Bestrahlung unverändert bleiben, daß Leucin als Berechnungsgrundlage verwendet werden kann. Hätte Leucin nach Bestrahlung zu- oder abgenommen, wären die Werte für diese sehr strahlenresistenten Aminosäuren ver­fälscht worden. DENKL, der gleichfalls von Leucin ausging, kam diesbezüglich zu dem gleichen Ergebnis, konnte jedoch nur eine Abnahme des Tyrosins finden. ")

Das Auftreten von fünf Molekülen Cystin entspräche einer Abnahme um 10 von insgesamt 22 Cystein-Molekülen. Das ent­spricht den hohen Geschwindigkeitskonstanten dieser Aminosäure für die Reaktion mit den Radiolyseprodukten des Wassers ($K_{\text{OH}^\cdot} = 7.9 \cdot 10^9$, $K_{e^-_{aq}} = 8.7 \cdot 10^9$, $K_{\text{H}^\cdot} = 1.0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) und ist an sehr vielen cystein­haltigen Proteinen als Strahlenfolge beobachtet worden.

Die SH-Bestimmung ergab jedoch nur eine Abnahme von vier SH-Gruppen. (13) Diese Diskrepanz ist aus den Er­gebnissen der vorliegenden Versuche nicht erklärbar, lenkt jedoch die Aufmerksamkeit auf die Abnahme des Methionins; das durch Demethylierung in Homocystein übergehen und als solches S-S - Brücken sowohl unterein­ander als auch mit Cystein ausbilden könnte. Die ent­stehenden Körper würden sich lediglich durch ein bzw. zwei CH_2 -Gruppen von Cystin unterscheiden und könnten

") Alle in diesem und folgenden Abschnitten angegebenen Geschwindigkeitskonstanten wurden der Zusammenstellung von ANBAR und NETA entnommen. (41)

in der Aminosäurenanalyse mit diesem an einer Position eluiert werden. Auf diese Weise könnten im vorliegenden Fall maximal 60 % des für Cystin bestimmten Wertes auf Abbauprodukte des Methionins zurückgehen. Die Überprüfung dieser Hypothese ist nur in weitergehenden Experimenten möglich.

Es wird diskutiert, ob der Aktivitätsverlust durch Bestrahlung allein oder überwiegend auf die Zerstörung essentieller SH-Gruppen zurückzuführen ist. (42) Bekannt ist, daß selektive Blockierung der SH-Gruppen mit geeigneten Reagentien in vitro Enzyme völlig inaktivieren kann. Die genaue Bedeutung der essentiellen SH-Gruppen für die Aktivität ist jedoch noch immer nicht befriedigend aufgeklärt. (43) Dies erschwert die Bewertung des Zusammenhanges zwischen SH-Zerstörung und Inaktivierung durch Strahlen.

Es gibt immerhin zahlreiche Hinweise darauf, daß die Zerstörung von SH-Gruppen für den Verlust an Aktivität keinen bedeutenderen Rang besitzt, als andere Einzeleffekte der Strahlenschädigung auch. Zu diesem Ergebnis kommt auch E. MÜLLER durch die im Rahmen dieser Versuche durchgeführte SH-Bestimmung nach ELLMAN. Daraus ergibt sich eine nur durch Modifikation der Struktur verständliche Zunahme der frei an der Oberfläche des Moleküls gelegenen, sogenannten "freititrierbaren" SH-Gruppen bei gleichzeitiger Abnahme der Gesamtzahl der SH-Gruppen. Für die Annahme, daß die Zerstörung der SH-Gruppen größeren ursächlichen Anteil an der Konformationsänderung hätte, als die in dieser Arbeit sowie von WINSTEAD (44) und DENKL (1) beschriebene Zerstörung anderer Aminosäuren, besteht kein Anhalt. Die Existenz einer essentiellen Imidazol-Gruppe im LDH Molekül (45, 46, 47) und die Zerstörung des Histidins, das diese Gruppe enthält,

läßt gleicherweise eine direkte kausale Verknüpfung mit dem Aktivitätsverlust zu. Die Zerstörung essentieller SH-Gruppen kann in den vorliegenden Versuchen nicht als alleinige Ursache der strahleninduzierten Inaktivierung angesehen werden. Welche Rolle dieser Prozeß spielt, richtet sich offenbar nach einer Reihe von Faktoren wie dem Vorhandensein essentieller SH-Gruppen überhaupt, dem Sitz der SH-Gruppen im Molekül, der zur Anwendung gebrachten Dosis und dem Vorhandensein anderer essentieller Gruppen. Es wurden an nicht SH-haltigen Enzymen (Yeast-Enolase, WINSTEAD (31)) Inaktivierungskurven gemessen, die von den an LDH gemessenen nicht sehr verschieden sind. Die Inaktivierung erfolgte hier unabhängig von der SH-Zerstörung. Auch an unter Luft und unter Stickstoff bestrahlter Ribonuklease waren Inaktivierung und Reaktionsprodukte nicht mit Zerstörung des Cystins in diesem Enzym verknüpft. (4)

Das Auftreten von Cystin in bestrahlter LDH - R - M, also die Bildung von Disulfidbrücken, kann intra- oder intermolekular erfolgen. Wie aus der Tatsache, daß DENKL zwar Aggregat, nicht jedoch S-S-Brücken nachweisen konnte, zugleich aber keine verschiedene D_{37} fand, geschlossen werden kann, hat die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Aggregatbildung und die Inaktivierung keine hervorragende oder obligate Bedeutung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den Versuchen von DENKL S-S-Brücken in so geringer Menge auftraten, daß der Nachweis lediglich messtechnisch unmöglich war. Den oben gezogenen Schluß stellt dies allerdings nicht in Frage.

Neben Cystein zeigen auch Methionin, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin eine Abnahme, die den hohen Geschwindigkeitskonstanten mit $OH^\bullet$ (alle größer 10^9) entspricht. Eine bevorzugte Zerstörung dieser fünf Aminosäuren

wurde auch an unter N_2 bestrahlter Ribonuklease bezeichnet. (3, 4, 5, 6) WINSTEAD und REECE (44) fanden nach Bestrahlung von LDH unter Luft Cystein, Threonin, Serin, Alanin sowie Tryptophan verändert. Möglicherweise wird in Gegenwart von O_2 ein anderes Spektrum von Aminosäuren zerstört.

Die starke Abnahme von Prolin bei LDH- R - M läßt sich nicht mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten verstehen. Hier könnte der Einbau des Moleküls in den Peptidverband oder die Anordnung im Protein eine Rolle spielen. (Prolin nimmt nicht an der alpha-Helix teil, könnte also im Vergleich zu anderen Aminosäuren freier und ungeschützter liegen.)

Abnahmen geringeren Ausmaßes wurden auch bei Arginin, Isoleucin und Glutaminsäure gefunden. Es ist klar, daß mit höherer Dosis auch strahlenresistentere Aminosäuren angegriffen werden, bei niedrigerer Dosis dagegen nur besonders empfindliche. Dies erklärt zum Teil auch, warum DENKL nach Bestrahlung mit 226 Krad nur erst bei Cystein (mit der SH-Bestimmung) und bei Tyrosin eine zweifelsfreie Abnahme feststellen konnte. Prolin wurde von ihm nicht bestimmt.

Wie die Diskussion der Ergebnisse im Zusammenhang mit denjenigen anderer Autoren zeigt, sind die Mechanismen der Strahlenschädigung zahlreich und beeinflussen einander gegenseitig in Abhängigkeit von der Versuchsbedingungen. So tritt etwa die Aggregation von LDH in Anwesenheit von EDTA überhaupt nicht auf, sondern nur in reiner Enzymlösung. In diesem Fall hängt ihr Ausmaß nicht nur von der Dosis und der Enzymkonzentration ab, sondern auch von der Ionenstärke des Puffers. DENKL (1) fand nicht nur bei höherer Ionenstärke weniger ausgeprägte Aggregation als in den vorliegenden Versuchen, sondern auch bei Bestrahlung

in reinem H_2O einen flockigen Ausfall des Enzyms, also bedeutend stärkere Aggregation.

Noch vielfältiger sind die Vorgänge und Faktoren, die im Endeffekt zum Aktivitätsverlust beitragen. Nicht nur die Zerstörung von essentiellen SH-Gruppen und Imidazol-Gruppen, sondern auch Aggregation, Entfaltung oder noch subtilere Veränderungen der nativen Molekülkonformation, wie man sie als Folge der Zerstörung von einzelnen Aminosäuren postulieren muß, haben Anteil an dem summarisch gemessenen Aktivitätsverlust. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Erkenntnis, daß bei LDH vom Muskeltyp ($M_4 = LDH V$) die essentielle SH-Gruppe nicht außen am Molekül, sondern im Inneren einer jeden Untereinheit des Tetrameren liegt, und daß weiterhin das Coenzym mit dem Adenin - Ende in einer tiefen Spalte des LDH Moleküls gebunden wird, wobei noch ungeklärt ist, ob sich diese Spalte zwischen zwei Untereinheiten oder in einer Untereinheit befindet. (48, 49) Das am NADH befindliche, für die katalysierte Reaktion notwendige Proton befindet sich dabei in $13.8 \text{ \AA}$ Abstand von der essentiellen SH-Gruppe. Wenn man davon ausgeht, daß die aktive Funktion des Enzyms an die Intaktheit dieser diffizilen Strukturen gebunden ist, ist ohne weiteres vorstellbar, daß auch eine geringe Konformationsänderung den Zugang zur essentiellen SH-Gruppe oder zur Coenzym-Bindungsstelle beeinträchtigen oder die Abstände der katalytisch wichtigen Gruppen voneinander sowie ihre Lage zueinander verändern kann und so zur Abnahme der Aktivität führt, ohne daß die am katalytischen Zentrum beteiligten Gruppen selbst zerstört werden müssen. Andererseits ist klar, daß die Konformationsabhängigkeit der Aktivität je nach Art des Enzyms verschieden sein wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der im Zusammenhang damit entstandenen Arbeit von E. MÜLLER (13) weisen erneut darauf hin, daß der strahleninduzierte Aktivitätsverlust die unspezifische Folge verschiedener Einzeleffekte der Strahlenschädigung ist.

5. Zusammenfassung

LDH - R - M wurde in 0.067 M Phosphatpuffer, pH 7.1, J 0.15, durch Röntgenstrahlen inaktiviert. Die Produkte wurden auf Menge, Größe und Restaktivität in Abhängigkeit von der Dosis und der Konzentration untersucht.

Mit Hilfe der Gelchromatographie konnten drei Produktgruppen unterschieden werden: Gruppe I: Moleküle mit leichtem Aktivitätsverlust ohne Vergrößerung, Gruppe II: entfaltete Moleküle und kleinere Aggregate mit stark erniedrigter Aktivität, Gruppe III: Aggregate mit mehr als sechsfacher Vergrößerung des Stoke'schen Radius und ebenfalls stark erniedrigter Aktivität. Die Inaktivierung und die Aggregatbildung wurde in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration gemessen. Dabei ergab sich, daß sowohl die Werte für die D_{37} als auch die Aggregatbildung bei gleichem Inaktivierungsgrad mit der Konzentration zunehmen. Die Abhängigkeit der Aggregation von der Ionenstärke weist auf Bindung über elektrostatische Kräfte hin. Kleinere Bruchstücke konnten nicht nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von EDTA verhindert die Aggregation und hat einen Schutzeffekt auf LDH - R - M, der sowohl durch das Abfangen eines Teils der Wasserradikale als auch durch Verhinderung der Aggregation zustande kommen kann. Durch Aminosäurenanalyse konnte die Zerstörung einiger Aminosäuren festgestellt werden, deren jeweilige Abnahme sich aus den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Aminosäuren mit den Radiolyseprodukten des Wassers verstehen läßt. Der Aktivitätsverlust des Enzyms kann nicht auf einen Einzeleffekt der Strahlenschädigung zurückgeführt werden, wie es etwa die SH-Gruppen-Zerstörung ist, sondern muß als summarische Folge aller auftretenden Effekte wie der Entfaltung, Aggregation und der Zerstörung verschiedener Aminosäuren mit den daraus folgenden geringfügigen Konformationsänderungen angesehen werden.

6. Literatur

1. Denkl, C.P.: Dissertation, Erlangen (1971).
2. Sund, H., (Ed.): Pyridine Nukleotide - Dependent Dehydrogenases, Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg - New York. (1970)
3. Jung, H. und H. Schüssler: Z. Naturforsch. 21 b, 224 (1966).
4. Schüssler, H. und H. Jung: Z. Naturforsch. 22 b, 614 (1967).
5. Jung, H. und H. Schüssler: Z. Naturforsch. 23 b, 934 (1968).
6. Jung, H. und H. Schüssler: stud. biophys. 7, 23 (1968).
7. Slobodian, E. and M. Fleisher: Biochemistry 5, 2192 (1966).
8. Stevens, C.O., B.M. Tolbert and F.E. Reese: Arch. Biochem. Biophys. 102, 423 (1963).
9. Stevens, C.O., L.E. Henderson and B.M. Tolbert: Arch. Biochem. Biophys. 107, 367 (1964).
10. Shapira, R.: Int. J. Rad. Biol. 7, 537 (1963).
11. Haskill, J. S. and J.W. Hunt: Rad. Res. 31, 327 (1967).
12. Haskill, J. S. and J.W. Hunt: Rad. Res. 32, 606 (1967).
13. Müller, E.: Dissertation, Erlangen (1973).
14. Giese, A.C.: Cell Physiology, W.B. Saunders Comp., Philadelphia and London (1965).
15. Ruch, Th. C. and H.D. Prutton: Physiology and Biophysics, W.B. Saunders Comp., Philadelphia and London (1965).
16. Jaenike, R. und S. Knof: European J. Biochem. 4, 157 (1968).
17. Hakala, M.T., A. J. Glaid and G.W. Schwert: J. Biol. Chem. 221, 191 (1956).
18. Dertinger, H. und H. Jung: Molekulare Strahlenbiologie, Springer - Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969).
19. Warburg, O. und W. Christian: Biochem. Z. 286, 81 (1936).

20. Warburg, O.: Wasserstoffübertragende Fermente, Verlag Dr. W. Sängner, Berlin (1948).
21. Kubowitz, F. und P. Ott: Biochem. Z. 310, 405 (1942).
22. Bergmeyer, H. U. (Ed.): Methoden d. enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim (1962).
23. Griffin, J.H. and R. Criddle: Biochemistry 9, 1195 (1970).
24. Werner E.: unveröffentlicht.
25. Pfleiderer, G. und D. Jeckel: Biochem. Z. 329, 370 (1957).
26. Determann, H.: Gelchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967).
27. Spackman, D.H., W.H. Stein and S. Moore: Analytic, Chem. 30, 1190 (1958).
28. Wieland, Th. und G. Pfleiderer: Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 691 (1961).
29. Pesce, A., Th.P. Fondy, F. Stolzenbach, F. Castillo and N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 242, 2151 (1966).
30. Informationsschrift "Lactat - Dehydrogenase" der Fa. Boehringer - Mannheim GmbH., Mannheim (1965).
31. Winstead, J.A.: Rad. Res. 30, 832 (1967).
32. Winstead, J.A. and A.E. Gass: Rad. Res. 30, 208 (1967).
33. Adelstein, S.J.: Biochemistry 4, 891 (1965).
34. Lohmann, W., A.J. Moss and W.H. Perkins: J. Nuclear Med. 5, 304 (1965).
35. Lohmann, W. und A.J. Moss: Die Naturwissenschaften 53, 702 (1966).
36. Lohmann, W., A.J. Moss, W.B. Garland and D.M. Woodall: Separatum Experientia 22, 514 (1966).

37. Brintzinger, H., B. Prijs und H. Erlenmeyer: *Experientia* 16, 468 (1966).
38. Jones, M.M.: *Nature* 185, 96 (1960).
39. Eichhorn, M.: Dissertation, Erlangen (im Druck).
40. Jaenike, R., R. Koberstein und B. Teuscher: *Eur. J. Biochem.* 23, 150 (1971).
41. Anbar, M. und P. Neta: *Int. J. Appl. Rad. Isot.* 18, 493 (1967).
42. Sanner, T. and A. Pihl: *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 22, Suppl. 102, 53 (1968).
43. Pfeleiderer, G., Chr. Woenkhaus, D. Jeckel und K. Mella: in H. Sund (Ed.): *Pyridine Nucleotide - Dependent Dehydrogenases*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970).
44. Winstead, J. A. and T. C. Reece: *Rad. Res.* 41, 125 (1970).
45. Pfeleiderer, G. und D. Jeckel: *Eur. J. Biochem.* 2, 171 (1967).
46. Winer, A.D. and G.W. Schwert: *J. Biol. Chem.* 231, 1065 (1958).
47. Woenkhaus, Chr., J. Berghäuser, G. Pfeleiderer: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 473 (1969).
48. Mc Pherson, A., Jr.,: *J. Mol. Biol.* 51, 39 (1970).
49. Adams, M.J., Mc Pherson, A., Jr., M.G. Rossmann, R.W. Schevitz and A.J. Wonacott: *J. Mol. Biol.* 51, 31 (1970).
50. Informationsschrift "Sephadex^R - Gelfiltration in Theorie und Praxis" der Fa. Pharmacia, Uppsala (1969).

Herrn Professor Dr. Dr. H. Pauly möchte ich an dieser Stelle danken für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in der anregenden und kollegialen Atmosphäre seines Institutes anfertigen zu können.

Frau Dr. H. Schüßler, die diese Arbeit mit soviel Hilfsbereitschaft und Entgegenkommen betreut hat und stets für alle Fragen Zeit gehabt hat, bin ich zu herzlichem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Th. Schmidt möchte ich für seinen Rat und seine Hilfe bei der Durchführung der Dosismessung meinen Dank aussprechen.

L e b e n s l a u f :

Am 26. 9. 1947 wurde ich, Klaus Kunigk, als Sohn des Arztes Dr. med. Arno Kunigk und seiner Frau Hanna, geb. Roeder, in Hildesheim, Niedersachsen, geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Woltwiesche, Niedersachsen, wechselte 1958 auf das humanistische Gymnasium Andreanum in Hildesheim und legte dort am 21. 9. 1966 die Reifeprüfung ab.

1966 nahm ich im November an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Medizin auf, das ich im März 1973 mit dem Staatsexamen abschloß.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990